

# **Funktionelle Charakterisierung neuer Interaktionen zwischen chlamydialen Proteinen und Wirtszellproteinen**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

**Diplom-Biologin Nicole Borth**

geboren am 07.08.1983 in Bad Salzungen

Jena, im Februar 2011

Gutachter:

1. Prof. Hans Peter Saluz, Jena
2. Prof. Eberhard Straube, Jena
3. Prof. Andreas Pospischil, Zürich

Tag der Disputation: 24. Mai 2011

---

**Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Zusammenfassung.....	VIII
Abstract.....	IX
1. Einleitung .....	1
1.1 Einordnung der Chlamydien .....	1
1.2 Chlamydien als Pathogene .....	1
1.3 Entwicklungszyklus und Stoffwechsel.....	3
1.4 Wirt-Pathogen-Interaktionen.....	5
1.5 Typ-III-Sekretion .....	8
1.6 Hefe-Zweihybrid-System.....	9
1.7 Das Inklusionsmembranprotein A (IncA) .....	10
1.8 Ras-GTPase-aktivierendes Protein SH3-Domäne-Bindeprotein 1 (G3BP1).....	11
1.9 Die chlamydiale Protease CT441 .....	12
1.10 SRA1 als Ko-Aktivator des Estrogenrezeptors $\alpha$ .....	13
1.11 Zielstellung dieser Arbeit.....	15
2. Material und Methoden .....	16
2.1 Allgemeines .....	16
2.2 Material .....	16
2.2.1 Stämme und Zelllinien.....	16
2.2.2 Vektoren und Plasmide.....	17
2.2.3 Oligonukleotide .....	19
2.2.4 Medien.....	19
2.2.4.1 Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	19
2.2.4.2 Medien zur Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	20
2.2.4.3 Medien zur Kultivierung von Säugerzellen .....	20
2.2.4.4 Medium zur Konservierung von Chlamydien.....	20
2.2.5 Lösungen und Puffer .....	20
2.2.6 Chemikalien.....	23

2.2.7	Größenstandards .....	23
2.2.8	Enzyme .....	24
2.2.9	Antikörper .....	24
2.2.10	Kits .....	25
2.2.11	Geräte .....	25
2.2.12	Filme und Filter .....	26
2.3	Methoden .....	27
2.3.1	Transformation von <i>E. coli</i> .....	27
2.3.1.1	Herstellung von chemisch kompetenten Zellen .....	27
2.3.1.2	Transformation von chemisch kompetenten Zellen .....	27
2.3.1.3	Herstellung von elektrokompenten Zellen .....	27
2.3.1.4	Transformation von elektrokompenten Zellen .....	28
2.3.2	Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation) .....	28
2.3.3	Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Midi- und Maxipräparation) .....	29
2.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	29
2.3.5	Gelelektrophorese, Restriktion, Ligation, und Aufreinigung von Plasmid-DNA .....	29
2.3.6	Mutagenese mittels Fehler-PCR .....	30
2.3.7	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	30
2.3.7.1	Herstellung von kompetenten <i>S. cerevisiae</i> Zellen .....	30
2.3.7.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	30
2.3.8	Hefe-Zweihybrid-System .....	31
2.3.9	Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i> .....	31
2.3.10	$\beta$ -Galaktosidase Filter- <i>Assay</i> .....	31
2.3.11	$\beta$ -Galaktosidase Flüssig- <i>Assay</i> .....	32
2.3.12	Kultivierung von Zelllinien .....	32
2.3.13	Transfektion von Zelllinien .....	33
2.3.13.1	Transfektion mit FuGene HD .....	33
2.3.13.2	Transfektion von siRNA .....	33
2.3.14	Infektion von Säugerzellen .....	33
2.3.14.1	Chlamydienstammkonservierung .....	33
2.3.14.2	Titerbestimmung .....	34

2.3.14.3	Infektion .....	34
2.3.15	Isolierung von RNA aus humanen Zellen .....	35
2.3.16	Semiquantitative PCR und <i>Real-Time</i> -quantitative-PCR .....	35
2.3.17	Direkte und indirekte Immunfluoreszenz .....	36
2.3.18	Estrogenrezeptor- <i>Assay</i> in <i>S. cerevisiae</i> .....	36
2.3.19	Transaktivierungs- <i>Assay</i> in Säugerzellen .....	36
2.3.20	Expression und Analyse von Proteinen .....	37
2.3.20.1	Bestimmung des Proteingehalts .....	37
2.3.20.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	37
2.3.20.3	Western Blot .....	37
2.3.20.4	<i>Stripping</i> von Nitrozellulose-Membranen .....	38
2.3.20.5	Bakterielle Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen .....	38
2.3.20.6	<i>In vitro</i> -Expression von Proteinen .....	38
2.3.20.7	GST- <i>Pulldown</i> und <i>in vitro</i> Interaktionsexperimente .....	38
2.3.20.8	Ko-Immunopräzipitation .....	39
3.	Ergebnisse .....	40
3.1	Funktionelle Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Typ-III-sekretierten Protein IncA aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> und dem humanen Ras-GTPase-aktivierendes Protein SH3-Domäne-Bindeprotein 1 (G3BP1) .....	40
3.1.1	IncA aus <i>Cp. psittaci</i> und das humane G3BP1 interagieren im Hefe-Zweihybrid-System .....	40
3.1.2	Die Gesamtproteine IncA aus <i>Cp. psittaci</i> und G3BP1 interagieren <i>in vitro</i> .....	42
3.1.3	<i>Cp. psittaci</i> IncA und G3BP1 interagieren <i>in vivo</i> in HEK293-Zellen .....	43
3.1.4	G3BP1 akkumuliert in <i>Cp. psittaci</i> -infizierten Hep2-Zellen um die Inklusionsmembran .....	44
3.1.5	Die Infektion von Hep2-Zellen mit <i>Cp. psittaci</i> hat keinen Einfluss auf die <i>c-myc</i> mRNA .....	46
3.1.6	Die Infektion von Hep2-Zellen mit <i>Cp. psittaci</i> führt zu einer Abnahme der c-Myc Proteinkonzentration .....	47
3.1.7	Die Abnahme der c-Myc-Proteinkonzentration kann der Interaktion zwischen IncA und G3BP1 zugeschrieben werden .....	48
3.1.7.1	Die c-Myc-Proteinkonzentration in HEK293-Zellen wird durch die Überexpression der zytoplasmatischen Domäne von IncA vermindert, jedoch nicht durch die mutierte Domäne .....	48
3.1.7.2	Der siRNA- <i>Knockdown</i> von G3BP1 in HEK293-Zellen führt zur Abnahme der c-Myc-Proteinkonzentration .....	50

3.2	IncA aus <i>Chlamydia trachomatis</i> interagiert mit G3BP1 .....	51
3.2.1	IncA aus <i>C. trachomatis</i> und G3BP1 interagieren im Hefe-Zweihybrid-System.....	51
3.2.2	IncA aus <i>C. trachomatis</i> und G3BP1 interagieren <i>in vitro</i> .....	52
3.3	Die Protease CT441 aus <i>C. trachomatis</i> interagiert mit dem humanen Steroidrezeptor $\alpha$ aktivierenden Protein SRAP1 .....	53
3.3.1	Die PDZ-Domäne von CT441 interagiert mit SRAP1 im Hefe-Zweihybrid-System.....	53
3.3.2	CT441 interagiert mit SRAP1 <i>in vitro</i> .....	54
3.3.3	Die PDZ-Domäne von CT441 kann SRAP1 in zelluläre Kompartimente dirigieren .....	55
3.3.4	SRAP1 wird nicht durch CT441 abgebaut .....	56
3.3.5	Die PDZ-Domäne von CT441 vermindert partiell die durch SRAP1 vermittelte Ko-Aktivierung des Estrogenrezeptors $\alpha$ in <i>S. cerevisiae</i> .....	57
3.3.6	CT441 vermindert die Ligand-unabhängige Ko-Aktivierung der ER $\alpha$ AF1-Domäne durch SRAP1 in humanen Zellen .....	59
3.4	Die PDZ-Protease Cpn0555 aus <i>Cp. pneumoniae</i> interagiert mit SRAP1 .....	61
3.4.1	Interaktion der Protease Cpn0555 mit SRAP1 im Hefe-Zweihybrid-System.....	61
3.4.2	Cpn0555 interagiert <i>in vitro</i> direkt mit SRAP1 .....	61
3.5	Die PDZ-Domäne von CT441 interagiert mit c-Myc in Hefe-Zweihybrid-System .....	63
4.	Diskussion .....	64
4.1	IncA interagiert mit G3BP1 .....	64
4.2	Die Protease CT441 interagiert mit SRAP1 .....	70
4.3	Die PDZ-Domäne von CT441 interagiert mit c-Myc in <i>S. cerevisiae</i> .....	73
5.	Ausblick .....	74
6.	Literaturverzeichnis.....	76
	Abbildungsverzeichnis.....	X
	Tabellenverzeichnis.....	XI
	Formelverzeichnis.....	XI
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	XII
	Wissenschaftliche Beiträge.....	XIII
	Danksagung.....	XIV

**Abkürzungsverzeichnis**

3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
aa	<i>amino acid</i>
A. bidest.	Aqua bidestillata
Act1	NF- $\kappa$ B-Aktivator 1
AF-1	<i>activation function-1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2 protein</i>
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaar)
BSA	Bovines Serumalbumin
C.	<i>Chlamydia</i>
CA	Chloramphenicol
CADD	<i>Chlamydia protein associating with death domain</i>
CD	<i>cytoplasmic domain</i> (zytoplasmatische Domäne)
ChlaDub	<i>Chlamydia deubiquitinating enzymes</i>
Cp.	<i>Chlamydomphila</i>
CPAF	<i>Chlamydial protease-like activity factor</i>
CTP	Cytidintriphosphat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DsRED	<i>Discosoma sp.</i> red fluorescent protein (rot fluoreszierendes Protein)
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
EK	Elementarkörper
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ER $\alpha$	Estrogenrezeptor $\alpha$
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

---

G3BP1	Ras-GTPase-aktivierendes Protein SH3-Domäne-Bindeprotein 1
β-gal	β-Galaktosidase
GAL4-AD	GAL4-Transkriptionsaktivator Aktivator-domäne
GAL4-BD	GAL4-Transkriptionsaktivator DNA-Bindedomäne
GAP	Ras-GTPase-aktivierendes Protein
GCIP	<i>Grap2 cyclin D-interacting protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HA	<i>hemagglutinin</i>
HD	<i>hydrophobic domain</i> (hydrophobe Domäne)
HEK293	<i>human embryonic kidney cells</i>
HEp-2	<i>human epidermoid cancer cells</i>
HI	Hitze-inaktiviert
HRE	<i>Hormone responsive elements</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IAP	<i>inhibitor of apoptosis proteins</i>
IL-17	Interleukin 17
IκBα	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
IncA	<i>Inclusion membrane protein A</i>
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IVT	<i>coupled T7 RNA polymerase-mediated in vitro transcription and translation</i>
Kana	Kanamycin
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
LPS	Lipopolysaccharide
Mcl-1	<i>induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1</i>
MHC I/II	<i>Major histocompatibility complex</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOMP	<i>Major outer membrane protein</i>
mRNA	<i>messengerRNA</i>
myc	<i>myelocytomatosis oncogene</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NTF2	<i>Nuclear transport factor 2</i>
NUE	Nuklearer Effektor
OD	Optische Dichte



ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rab	<i>Ras (Rat sarcoma)-protein related in brain</i>
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RGG	Arginin-Glyzin-reiche Domäne
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RK	Retikularkörper
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RRM	<i>RNA recognition motifs</i>
RRX	Rhodamin X
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
siRNA	<i>small interference RNA</i>
SNARE	<i>soluble NSF-sensitive attachment receptor</i>
SRA1	Steroidrezeptor-RNA-Aktivator 1
SRAP1	Steroidrezeptor-RNA-Aktivator Protein 1
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
TARP	<i>translocated actin recruiting phosphoprotein</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tsp	<i>Tail specific protease</i>
TTP	Thymidintriphosphat
U	<i>Units</i>
UAS	<i>Upstream activating sequence</i>
USP10	<i>Ubiquitin specific protease 10</i>
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumenanteil)
w/o	<i>without</i>
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewichtsanteil)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>

## Zusammenfassung

Chlamydien sind bakterielle, obligat intrazelluläre Parasiten, die sich durch einen zweiphasigen Entwicklungszyklus auszeichnen, welcher in einem vakuolären Einschlusskörper, genannt Inklusion, abläuft. Sie exprimieren Wirts-interagierende Proteine, sekretieren diese mithilfe der Typ-II- oder Typ-III Sekretionssysteme und können so direkt in zelluläre Prozesse des Wirtes eingreifen. In Hefe-Zweihybrid-Screenings wurden verschiedene Effektoren von humanpathogenen und zoonotischen Chlamydien als Köderproteine eingesetzt. Unter Anderen wurde die Interaktion zwischen dem Typ-III-sekretierten, membranständigen Protein IncA aus *Cp. psittaci* und dem humanen G3BP1 identifiziert. Durch GST-Pulldown- und Ko-Immunopräzipitationsexperimente konnte die Bindung der beiden Proteine *in vitro* und *in vivo* bestätigt werden. Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde die Anreicherung von G3BP1 um den Einschlusskörper in *Cp. psittaci*-infizierten HEp-2-Zellen gezeigt. Sowohl die Infektion von HEp-2-Zellen mit *Cp. psittaci* als auch die Überexpression von IncA in HEK293-Zellen und der G3BP1-Knockdown mittels siRNA führten zu einer Abnahme der c-Myc-Proteinkonzentration. Die *c-myc* mRNA blieb jedoch unbeeinflusst, wie sich in Real-Time-PCR-Experimenten zeigte. Der Effekt der Abnahme von c-Myc könnte der Interaktion zwischen IncA und G3BP1 zugeschrieben werden, da die Überexpression eines mutierten IncA-Konstrukts, welches nicht mehr mit G3BP1 interagiert, keinen Einfluss auf die c-Myc-Konzentration hatte. Trotz sehr geringer Sequenzhomologie war auch mit IncA aus *C. trachomatis* die Interaktion mit G3BP1 in *S. cerevisiae* und *in vitro* nachweisbar. Es wird diskutiert über welche zellulären Mechanismen die Abnahme des c-Myc-Proteins vermittelt werden könnte und welche Folgen daraus sowohl für die Chlamydien als auch für die Wirtszelle resultieren. Ein weiteres Köderprotein, das im Hefe-Zweihybrid-System verwendet wurde, war die PDZ-Domäne der chlamydialen, Typ-II-sekretierten Protease CT441 aus *C. trachomatis*. Neben einigen anderen Wirtsproteinen konnte das humane Steroidrezeptor-Ko-Aktivator Protein SRAP1 als Interaktionspartner identifiziert werden. Dieser Modulator der Estrogenrezeptor-Aktivität ist als RNA sowie als Protein funktionell. Die Interaktion zwischen CT441 und SRAP1 wurde in *S. cerevisiae* und *in vitro* nachgewiesen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die PDZ-Domäne SRAP1 in zelluläre Kompartimente dirigieren kann und in *S. cerevisiae* die Estrogenrezeptor-Aktivierung partiell vermindert. SRAP1 wird nicht durch CT441 gespalten, sondern im Zytoplasma zurückgehalten. Dadurch wird auch im eukaryotischen Zellsystem die durch SRAP1 vermittelte Ko-Aktivierung des Estrogenrezeptors  $\alpha$  von CT441 herabgesetzt. Mögliche Auswirkungen der spezifischen Bindung des Proteins SRAP1 durch CT441 bzw. durch die PDZ-Domäne auf die Regulation des Wirtszell-Metabolismus werden diskutiert.

**Abstract**

*Chlamydiaceae* are obligate intracellular pathogens which proliferate in a vacuolar compartment termed inclusion. They are distinguished by a unique biphasic developmental cycle. Through type II and type III secretion systems, Chlamydiae secrete host-interactive proteins capable of directly modulating eukaryotic pathways. For Yeast Two-Hybrid screenings different effectors of human pathogen and zoonotic Chlamydiae were used as baits. Among others, the interaction between the type III secreted membrane bound protein IncA of *Cp. psittaci* and human G3BP1 could be observed. In GST-pulldown and co-immunoprecipitation experiments, both *in vitro* and *in vivo* interactions were shown. Using fluorescence microscopy, the localization of G3BP1 near the inclusion membrane of *Cp. psittaci*-infected HEp-2-cells was demonstrated. The infection of HEp-2-cells with *Cp. psittaci* as well as the overexpression of IncA in HEK293-cells and the knockdown of G3BP1 using siRNA led to a decrease in c-Myc protein concentration. The effect of decreasing c-Myc-concentration could be ascribed to the interaction between IncA and G3BP1, since overexpression of an IncA mutant construct, which was not able to interact with G3BP1, failed to reduce c-Myc protein concentration. *c-myc* mRNA remained unaffected as was shown in real-time PCR experiments. Despite very low sequence homology IncA of *C. trachomatis* was also able to interact with G3BP1 in *S. cerevisiae* and *in vitro*. The cellular mechanisms underlying the decrease of c-Myc protein concentration and the consequences for both chlamydia and for the host cell are discussed. Another bait used in Yeast Two-Hybrid screenings was the PDZ domain of chlamydial type II secreted protease CT441 of *C. trachomatis*. In addition to some more interacting host proteins, human steroid receptor co-activator protein SRAP1 was identified. SRAP1 is a modulator of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) activity and is able to function both as RNA and as a protein. The interaction between CT441 and SRAP1 was demonstrated in *S. cerevisiae* and *in vitro*. Additionally, it was shown that the PDZ domain of CT441 was able to bind and target SRAP1 in cellular compartments. In heterologous yeast system, the ER $\alpha$  co-activation of SRAP1 was partially alleviated by the PDZ domain. SRAP1 is not cleaved by CT441 but it is retained in the cytoplasm and thereby, the SRAP1 mediated co-activation of ER $\alpha$  was also diminished in mammalian cells. Possible implications of chlamydial regulation of host metabolism by targeting ER $\alpha$  activity through specific binding of SRAP1 to CT441 or PDZ domain are discussed.

## 1. Einleitung

### 1.1 Einordnung der Chlamydien

Chlamydien sind gramnegative Bakterien, welche als Pathogene eine Vielzahl von Wirten parasitieren und unterschiedlichste Krankheiten auslösen können. Nach ihrer Entdeckung 1907 wurden sie aufgrund des obligat intrazellulären Lebensstils, ihrer geringen Größe und der nicht möglichen Kultivierung lange Zeit als Viren betrachtet. Das Genus *Chlamydia* wurde 1966 eingeführt und war über Jahre die einzige Gattung in der einzigen Ordnung der *Chlamydiales* mit der Familie *Chlamydiaceae*. Inzwischen wurden mittels Sequenzanalysen unterschiedliche Arten entdeckt und diese taxonomisch eingeordnet (Everett *et al.*, 1999). Die Familie *Chlamydiaceae* wird in die Gattungen *Chlamydia* und *Chlamydophila* unterteilt. Zu *Chlamydia* zählt neben zwei weiteren Arten der humanpathogene Erreger *Chlamydia (C). trachomatis*. *Chlamydophila* umfasst neben dem ebenfalls humanpathogenen *Chlamydophila (Cp.) pneumoniae* noch die zoonotischen Arten *Cp. abortus* und *Cp. psittaci* (früher *Cp. caviae*), sowie drei weitere Arten (Bush und Everett, 2001).

Alle Chlamydienarten besitzen ein relativ kleines Genom mit einer Größe von etwa 1 Mbp (Stephens *et al.*, 1998; Kalman *et al.*, 1999). Es ist bekannt, dass die Genome der Familie *Chlamydiaceae* hoch konserviert sind, jedoch kommen durchaus nichthomologe Bereiche in den kodierenden Sequenzen vor. Die Expression der speziesspezifischen Proteine könnte Unterschiede zwischen den Arten bezüglich Metabolismus, Wirtszelltropismus und Pathogenese bestimmen (Kalman *et al.*, 1999).

### 1.2 Chlamydien als Pathogene

*C. trachomatis* und *Cp. pneumoniae* sind die bedeutenden humanpathogenen Arten der Chlamydien. Dabei existieren verschiedene Serovare, welche unterschiedliche Erkrankungen auslösen können. Namensgebend für *C. trachomatis* ist die Ausbildung eines Trachoms, *Konjunktivitis trachomatosa*, bei einer Infektion des Augenepithels durch die Serovare A bis C. Das Trachom ist die in Entwicklungsländern am häufigsten auftretende Augenerkrankung und kann unbehandelt zu Erblindung führen. Des Weiteren ist die Infektion mit den *C. trachomatis* Serovaren D bis K die häufigste Ursache von

sexuell übertragbaren Krankheiten bakteriellen Ursprungs. Zwar verläuft die Infektion des Urogenitaltraktes bei 85% der infizierten Frauen asymptomatisch, kann jedoch in schwerwiegenden Fällen zu ektopischen Schwangerschaften, Eileiterentzündungen, Schwangerschaftsabbrüchen und/ oder Infertilität führen (Paavonen und Eggert-Kruse 1999). Die *C. trachomatis* Infektion wurde ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Gebärmutterhalskrebs in Zusammenhang gebracht (Luostarinen *et al.*, 2004; Silins *et al.*, 2005; Schlott *et al.*, 2005). Darüber hinaus ist *C. trachomatis* in der Rheumatologie als ein Auslöser der Chlamydien-induzierten Arthritis bedeutsam (Carter und Hudson, 2010).

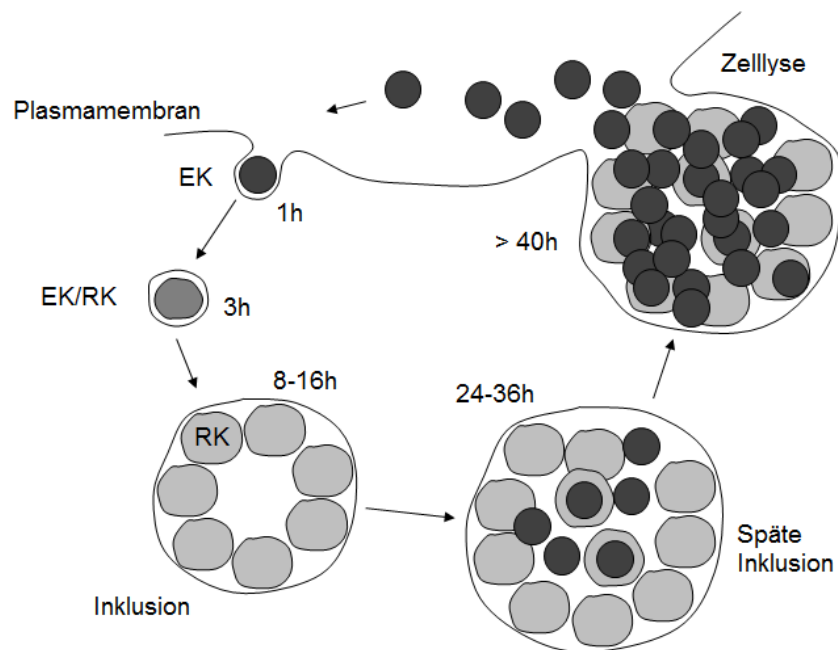
*Cp. pneumoniae* ist ein häufiger Erreger von respiratorischen Infektionen, wobei das klinische Bild einer akuten Infektion vom asymptomatischen Verlauf über milde Erkrankung bis zur Bronchitis und Pneumonie reicht (Blasi *et al.*, 2009). Der Übertragungsweg von *Cp. pneumoniae* ist die Tröpfcheninfektion, wodurch eine wesentlich höhere Prävalenzrate als bei *C. trachomatis* erreicht wird. Auch bei *Cp. pneumoniae* kann es zu weitreichenderen Erkrankungen kommen, die durch Sekundärinfektionen ausgelöst werden. So gibt es Studien über die Zusammenhänge einer unmittelbaren Ansteckung und dem akuten Koronarsyndrom (ACS) bzw. der Erkrankung an Atherosklerose bei einer chronischen Infektion (Pesonen *et al.*, 2009). Asthmapatienten sind häufiger mit *Cp. pneumoniae* infiziert als die gesunden Probanden der Kontrollgruppen (Cosentini *et al.*, 2008). Und auch das Auftreten von Multipler Sklerose und Alzheimer wird in Verbindung mit einer *Cp. pneumoniae*-Infektion diskutiert (Stratton und Wheldon, 2006; Balin und, Appelt 2001).

Neben den humanen Erkrankungen spielen Chlamydieninfektionen aber auch bei zahlreichen domestizierten und wildlebenden Tieren eine Rolle. Die bedeutendsten Vertreter sind *Cp. psittaci*, der Erreger der Ornithose bei Vögeln, und *Cp. abortus*, welcher bei Schafen und Ziegen den enzootischen Abort auslösen kann. Diese Chlamydienarten besitzen nur eine geringe Wirtsspezifität und können auf andere Tierarten und den Menschen übertragen werden. Solche Erkrankungen werden Zoonosen genannt (Rohde *et al.*, 2010). Während eine *Cp. psittaci*-Infektion bei Vögeln nahezu ohne Symptome verlaufen kann, manifestieren sich bei Rind, Schwein und dem Menschen Entzündungen im Respirations- und Genitaltrakt. In seltenen Fällen können auch Erkrankungen des Bewegungsapparates, der Augen und des Zentralnervensystems auftreten (Beeckman und Vanrompay, 2009). *Cp. abortus* löst nicht nur bei Schafen, Ziegen und Rindern den Abort

aus, was neben dem gesundheitlichen Aspekt auch von enormer wirtschaftlicher Bedeutung ist, sondern kann auch bei schwangeren Frauen zu einer schweren septischen Infektion und dem frühzeitigen Abort des Fötus führen (Pospischil *et al.*, 2002).

### 1.3 Entwicklungszyklus und Stoffwechsel

Chlamydien durchlaufen einen komplexen Lebenszyklus, der sich durch zwei Differenzierungsschritte auszeichnet (Abbildung 1). Die Infektion beginnt mit der Anlagerung des infektiösen, metabolisch inaktiven und sporenähnlichen Elementarkörpers (EK) an die Oberfläche der Wirtszelle. Das sekretierte Effektorprotein TARP (*translocated actin recruiting phosphoprotein*) vermittelt die Bildung von Aktinfilamenten an der Anheftungsstelle (Jewett *et al.*, 2006). Durch die Abschnürung des Vesikels wird der Erreger endozytiert. Die weitere Entwicklung läuft in diesem Einschlusskörper, auch Inklusion genannt, ab.



**Abbildung 1: Entwicklungszyklus der Chlamydien.**

Das infektiöse Elementarkörperchen (EK) wird endozytiert und differenziert zum metabolisch aktiven Retikularkörperchen (RK). Die Vermehrung erfolgt in der Inklusion, einer parasitophoren Vakuole, die nicht endosomal prozessiert wird. In der späten Phase des Zyklus re-differenzieren die RK zu EK und werden aus der Wirtszelle entlassen.

Bereits 30 Minuten nach dem Eintritt werden die Markerproteine der Einschlusskörpermembran entfernt, wodurch die Chlamydien enthaltende Vakuole getarnt und nicht wie andere Vesikel in endosomale Reifungsprozesse der Wirtszelle eingebunden

wird (Scidmore *et al.*, 2003). In der Inklusion differenziert sich der EK zum Retikularkörper (RK), der metabolisch aktiven, sich vermehrenden Form. Durch einfache, asynchrone Teilung entstehen mehr als tausend Nachkommen, welche sich an der Innenseite der Einschlusskörpermembran anlagern. Nach zwei bis drei Tagen, abhängig von der Chlamydienart, lösen sich die RK von der Membran und re-differenzieren zu EK, welche schon die notwendigen Pathogenitätsfaktoren für die Infektion weiterer Wirtszellen besitzen. Durch eine Apoptose-ähnliche Wirtszelllyse werden die infektiösen EK in das extrazelluläre Medium entlassen und der Entwicklungskreislauf kann von Neuem beginnen. Dieser klassische zweiphasige Infektionszyklus läuft so jedoch nur unter optimalen Bedingungen für den Erreger ab. Das dritte Stadium, die Persistenz, kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden und ist von hoher medizinischer Bedeutung. Chronische Krankheitsverläufe sind mit der ständigen Aktivierung des Wirtszellimmunsystems verbunden, jedoch kann die Chlamydieninfektion in dieser Phase nur unzureichend bekämpft werden (Hogan *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2005).

Während dieses einzigartigen Lebenszyklus benötigen die replizierenden und sich teilenden Chlamydien Energie und biosynthetische Bausteine aus der Wirtszelle, da sie aufgrund ihrer starken Genomkondensation nicht mehr zu allen notwendigen Synthesewegen und Stoffwechselprozessen befähigt sind (Kalman *et al.*, 1999; Read *et al.*, 2003). Beispielsweise erfolgt die Beschaffung von Purinen und Pyrimidinen, welche sowohl für die DNA-Synthese als auch für den Energiestoffwechsel gebraucht werden, über ein spezielles Nukleotid-Transportsystem (Tjaden *et al.*, 1999). Auch Aminosäuren, die nicht oder nur unvollständig selbst synthetisiert werden können, gelangen über bestimmte Transportsysteme zum Erreger (Kalman *et al.*, 1999; Read *et al.*, 2003; Braun *et al.*, 2008). Darüber hinaus benötigen Chlamydien Membranlipide, wie Glyzerophospholipide, Sphingolipide und Cholesterol, für den Einbau in die Einschlusskörpermembran (Wylie *et al.*, 1997; Hackstadt *et al.*, 1995; Carabeo *et al.*, 2003). Dafür greifen sie in vesikuläre Transportprozesse ein, wobei der Einschlusskörper selbst nicht in das zelluläre Endosomen/Lysosomen-System einbezogen und zerstört wird. Der genaue Ablauf dieser molekularen Prozesse ist noch unvollständig verstanden. Eindeutig gezeigt wurde die Fragmentierung des Golgiapparates während der Infektion, was die Nährstoffaufnahme für die Chlamydien erleichtert (Heuer *et al.*, 2009). Der Transport der Lipide erfolgt über exozytotische Vesikel aus dem Golgiapparat (Hackstadt

*et al.*, 1996), durch späte Endosomen (Beatty, 2006) oder über Lipidtröpfchen in das Lumen der parasitophoren Vakuole (Cocchiario *et al.*, 2008).

#### **1.4 Wirt-Pathogen-Interaktionen**

Neben dem Zelleintritt und der Beschaffung von Nährstoffen müssen Chlamydien auch zelluläre Funktionen wie die Immunantwort und Apoptose beeinflussen. In alle diese Prozesse können sie eingreifen, indem sie Wirts-interagierende Proteine exprimieren und diese über Typ-II- oder Typ-III-Sekretionssysteme in die Wirtszelle transportieren (Betts *et al.*, 2009).

Wie bereits erwähnt kommt es direkt nach der Anheftung des EK an die Zelloberfläche zur Bildung von Aktinfilamenten. Diese Umlagerung von Aktin wird durch die humane Rho-GTPase Rac1 vermittelt (Carabeo *et al.*, 2007). Das sekretierte Effektorprotein TARP wird in der Zelle phosphoryliert und rekrutiert GTP-Austauschfaktoren, welche Rac1 aktivieren (Lane *et al.*, 2008). Alternativ besitzt TARP selbst eine Aktin bindende Domäne und kann die Nukleation vorantreiben (Jewett *et al.*, 2006). Ein weiteres Protein, das in die Zellarchitektur über die Modulation des Aktinzytoskeletts eingreift ist CT694. Es interagiert mit AHNAK, einem 700kDa großen Protein, das Komplexe mit Aktin bildet, und kann bei ektopischer Expression mit diesem Protein ko-lokalisieren (Hower *et al.*, 2009).

Um die Versorgung der wachsenden parasitophoren Vakuole zu sichern, greifen Chlamydien in Prozesse des Endosom-*Recyclings* ein. Humane Rab-GTPasen assoziieren mit der Einschlusskörpermembran (Rzomp *et al.*, 2003). Dabei spielen direkte Protein-Protein-Interaktionen mit Inklusionsmembranproteinen (Inc-Proteine) eine Rolle. Beispielsweise interagiert das Inc-Protein CT229 aus *C. trachomatis* mit Rab4 und für *Cp. pneumoniae* ist die Bindung von Rab1, 10 und 11 an Cpn0585 beschrieben worden (Rzomp *et al.*, 2006; Cortes *et al.*, 2007). SNARE (*soluble NSF-sensitive attachment receptor*) Proteine regulieren in der uninfizierten Zelle ebenfalls die Membranfusion und werden von chlamydialen Proteinen beeinflusst. Die Inc-Proteine IncA, CT223 und CT813 besitzen SNARE ähnliche Motive und können eine ganze Reihe von Wirtszell SNAREs binden (Delevoye *et al.*, 2008).

Von entscheidender Wichtigkeit für die erfolgreiche Entwicklung der Erreger in der Wirtszelle sind neben der Nährstoffbeschaffung auch die Verhinderung der zellulären



Immunantwort und des apoptotischen Zelltods (Cocchiario und Valdivia, 2009). Die Abläufe der Einflussnahme der Chlamydien auf diese Signalwege sind sehr komplex. Die Typ-II-sekretierte Protease CPAF (*chlamydial protease-like activity factor*) spielt dabei mehrere entscheidende Rollen (Paschen *et al.*, 2008). Beispielsweise wurde beschrieben, dass CPAF während der Infektion den proteasomabhängigen Abbau von pro-apoptotische BH3-only Proteinen beeinflusst, wodurch die mitochondriale Cytochrom C-Freisetzung verringert und damit Apoptose inhibiert wird (Fan *et al.*, 1998; Pirbhai *et al.*, 2006). Außerdem ist CPAF ein zentraler Regulator der Immunreaktion, indem es die MHC I/II (*Major histocompatibility complex*) vermittelte Antigenpräsentation durch den Abbau der Transkriptionsfaktoren USF-1 und RFX-5 vermindert (Zhong *et al.*, 2001). Neben der durch CPAF vermittelten Inhibierung von Apoptose gibt es, wie auch bei der Modulation des Vesikeltransports, weitere Mechanismen. Über die Interaktion des chlamydialen Membranproteins IncG mit dem humanen 14-3-3 $\beta$  wird das pro-apoptotische BAD an der Einschlusskörpermembran zurückgehalten (Scidmore und Hackstadt, 2001; Verbeke *et al.*, 2006). Des Weiteren werden IAP-IAP (*inhibitor of apoptosis proteins*) Komplexe stabilisiert (Rajalingam *et al.*, 2006) und die Expression des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 in infizierten Zellen erhöht (Rajalingam *et al.*, 2008). Mcl-1 ist auch bei der Aktivierung des Raf/MEK/ERK/cPLA2 Signalweges beteiligt, welcher bei der Beschaffung von Lipiden eine essentielle Rolle spielt (Su *et al.*, 2004).

Die Einflussnahme auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg ist ein wesentlicher Baustein bei der Sicherung des Überlebens von Chlamydien in der Wirtszelle. Die NF- $\kappa$ B-Untereinheiten RelA (p65) und p50 bilden ein Heterodimer, wandern in den Zellkern und funktionieren dort als Transkriptionsaktivator (Hayden *et al.*, 2006). Bei der chlamydialen Infektion wird RelA proteolytisch durch die Tsps (*Tail specific proteases*) CT441 und CPAF gespalten und gelangt nicht mehr in den Zellkern (Lad *et al.*, 2007a; Christian *et al.*, 2010). Außerdem verhindert CT441 die TNF- $\alpha$ -induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B in humanen Zellen. Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges kann jedoch auch über weitere Mechanismen beeinflusst werden. Zum Einen wird in *C. trachomatis* der Ubiquitin-vermittelte Proteinabbau von I $\kappa$ B $\alpha$ , dem Inhibitor von NF- $\kappa$ B, durch die Bindung der Proteine ChlaDub1 und ChlaDub2 verhindert (Le Negrate *et al.*, 2008). Zum Anderen wurde für *Cp. pneumoniae*, dem ChlaDub1 fehlt, beschrieben, dass der NF- $\kappa$ B-Aktivator Act1 durch die Interaktion mit dem Inc-Protein Cpn0236 an der Einschlusskörpermembran

zurückgehalten und so die IL-17-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung beeinträchtigt wird (Wolf, *et al.*, 2009).

**Tabelle 1: Sekretierte chlamydiale Effektorproteine.**

Effektor	Sekretion	Lokalisierung in der Wirtszelle	Funktion
TARP	T3SS	Zytoplasma	Aktinrekrutierung und –nukleation, Rac1-Aktivierung
CT694	T3SS*	Assoziiert mit Chlamydien	Interaktion mit AHNAK, Einfluss auf Aktinzytoskelett
CT229	T3SS*	Inklusionsmembran	Interaktion mit Rab4, Endosom- <i>Recycling</i>
Cpn0585	T3SS*	Inklusionsmembran	Interaktion mit Rab1, 10 und 11, Endosom- <i>Recycling</i>
IncA	T3SS	Inklusionsmembran	Interaktion mit SNAREs
CT223	T3SS*	Inklusionsmembran	Interaktion mit SNAREs
CT813	T3SS*	Inklusionsmembran	Interaktion mit SNAREs
IncG	T3SS*	Inklusionsmembran	Interaktion mit 14-3-3 $\beta$ , Inhibierung von Apoptose
CPAF	T2SS	Zytoplasma	Tsp, Vielzahl von Funktionen, Inhibierung der Wirtszellapoptose, Abbau von Transkriptionsfaktoren, die für die Immunantwort wichtig sind
CT441	T2SS	Zytoplasma	Tsp mit PDZ-Domäne, spaltet RelA(p65) von NF- $\kappa$ B
ChlaDub1	Nicht definiert	Zytoplasma	Verhinderung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbaus
ChlaDub2	Nicht definiert	Zytoplasma	Verhinderung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbaus
Cpn0236	T3SS*	Inklusionsmembran	Interaktion mit Act1, Verminderung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung
CT847	T3SS	Zytoplasma	Interaktion mit GCIP, Zellzyklus
NUE	T3SS*	Zellkern	Histon-Methyltransferase
CADD	T3SS	Zytoplasma	Interaktion mit TNF-Rezeptoren, Wirtszelltod

\*vermutlich

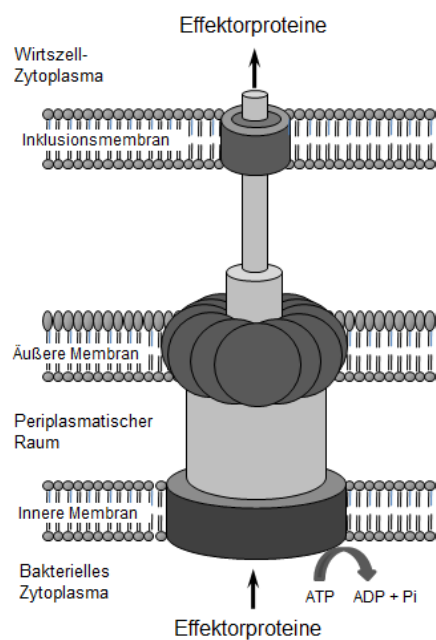
Daneben gibt es weitere sekretierte chlamydiale Proteine, die Einfluss auf den Zellzyklus und die Genexpression der Wirtszelle nehmen. Die direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen CT847 und dem humanen GCIP (*Grap2 cyclin D-interacting protein*) fördert den Abbau von GCIP und ist somit an der Modulation des Zellzyklus beteiligt (Chellas-Géry *et al.*, 2007). Der Nukleare Effektor NUE wird in den Zellkern transportiert, assoziiert dort mit dem Chromatin und agiert als Histon-Methyltransferase (Pennini *et al.*, 2010).

Nach dem vollständigen Ablauf des Infektionszyklus müssen die EK aus der Wirtszelle entlassen werden. Das chlamydiale Protein CADD (*Chlamydia protein associating with death domain*) kann, wenn es ektopisch exprimiert wird, über die sogenannte „Todesdomäne“ mit TNF-Rezeptoren interagieren und über den extrinsischen Weg Apoptose induzieren (Stenner-Liewen *et al.*, 2002). Allerdings ist die Relevanz dieser

Interaktion nicht eindeutig, da der Wirtszelltod am Ende der chlamydialen Infektion nicht-apoptotisch abzulaufen scheint (Ying *et al.*, 2006).

## 1.5 Typ-III-Sekretion

Wie viele andere Gram-negative Bakterien verwenden Chlamydien für die Sekretion der Effektorproteine die Typ-II- und Typ-III-Sekretionssysteme (Saier, 2006). Die chlamydialen Proteasen CT441 und CPAF besitzen ein Typ-II-Sekretionssignal und werden zunächst in das Einschlusskörperlumen sekretiert. Zumindest für CPAF wurde die anschließende Translokation in das Zytoplasma der infizierten Zelle gezeigt (Heuer *et al.*, 2003). Die meisten der oben genannten Proteine werden jedoch mit Hilfe des Typ-III-Sekretionssystems (T3SS) in die Wirtszelle transportiert. Abbildung 2 zeigt den schematischen, innerhalb der Arten sehr konservierten Aufbau des T3SS (Peters *et al.*, 2007).



**Abbildung 2: Typ-III-Sekretionssystem.**

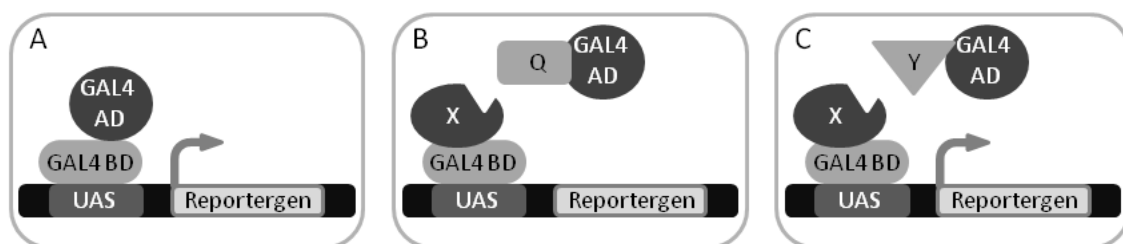
(Nach Peters *et al.*, 2007). Vom Exporter in der inneren Bakterienmembran werden die Effektorproteine durch den Basalkörper in die äußere Bakterienmembran transportiert. Von dort gelangen sie durch das Injektisom zur Einschlusskörpermembran.

Der Sekretionsapparat besteht aus einem Exporter, welcher in der inneren Bakterienmembran liegt und mit einer membrangebundenen ATPase assoziiert ist. Die Strukturproteine dieses Exporters interagieren mit Chaperonen und Effektorproteinen und vermitteln den Transport durch den Basalkörper zur äußeren Bakterienmembran. Von dort

werden die sekretorischen Proteine durch das sogenannte Injektisom, eine nadelähnliche Struktur, bis zu den, in der Einschlusskörpermembran liegenden, Translokatorproteinen transportiert. Von hier werden die Effektorproteine entweder in das Wirtszellzytoplasma abgegeben oder in die Inklusionsmembran eingebaut. Jedes einzelne Bakterium besitzt hunderte solcher Nadelkomplexe, die in seiner Membran verteilt sind.

## 1.6 Hefe-Zweihybrid-System

Die Auffindung neuer direkter Protein-Protein-Interaktionen ist substanziell für das Verstehen der molekularen Prozesse während der chlamydialen Infektion. Das Hefe-Zweihybrid-System ist eine etablierte Methode um Interaktionen zwischen sekretierten chlamydialen Effektorproteinen und humanen Zielproteinen zu identifizieren (Fields und Song, 1989). Dafür wird der GAL4-Transkriptionsaktivator aus *S. cerevisiae* verwendet, welcher zwei Domänen besitzt und normalerweise für die Expression von Enzymen des Galaktose-Stoffwechsels gebraucht wird. Die N-terminale DNA-Bindedomäne kann an spezifische DNA-Sequenzen binden, ist aber nicht in der Lage die Transkription zu aktivieren. Die C-terminale Aktivator-domäne besitzt zwar die Aktivatorregion, kann aber ebenfalls nicht die Transkription aktivieren, da ihr die Fähigkeit fehlt an DNA zu binden. Nur beide Domänen zusammen können die Expression des Reporters einleiten (Abbildung 3A).



**Abbildung 3: Hefe-Zweihybrid-System.**

(A) GAL4-DNA-Bindedomäne (BD) und GAL4-Aktivator-domäne (AD) binden an die *Upstream activating sequence* (UAS) und aktivieren die Transkription des Reportergens. (B) Interagieren die fusionierten Proteine nicht, wird das Reportergen nicht abgelesen. Nur wenn die Fusionsproteine direkt interagieren, kommen GAL4-BD und GAL4-AD wieder zusammen und aktivieren die Transkription.

Das Typ-III-sekretierte „Köderprotein“ wird an die GAL4-DNA-Bindedomäne (GAL4-BD) fusioniert und zusammen mit einer humanen cDNA-Bibliothek, welche mit der GAL4-Aktivator-domäne (GAL4-AD) fusioniert ist, in *S. cerevisiae* transformiert. Interagieren das Effektorprotein und das eingebrachte Bankprotein nicht, erfolgt keine

Transkriptionsaktivierung (Abbildung 3B). Falls aber das Effektorprotein mit einem anderen Protein der Bank direkt interagiert, werden die beiden GAL4-Domänen wieder in räumlicher Nähe zusammengeführt. Der Transkriptionsfaktor kann dann über die Bindung an die sogenannte UAS (*Upstream activating sequence*) die Transkription der Reportergene, in dieser Arbeit sind es *HIS3* und *lacZ*, regulieren (Abbildung 3C).

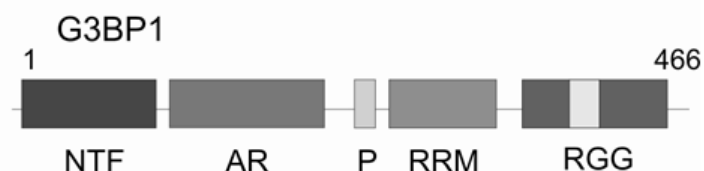
### 1.7 Das Inklusionsmembranprotein A (IncA)

Eine bedeutende Gruppe der Typ-III-sekretierten chlamydialen Effektorproteine ist die Familie der integralen Inklusionsmembranproteine (Incs) (siehe 1.4) (Rockey *et al.*, 2002). Sie besitzen eine sehr große, 50 bis 80 Aminosäuren umfassende, zweilappige hydrophobe Domäne, ein Sekundärstrukturmotiv, das für die Verankerung des Proteins in der Einschlusskörpermembran verantwortlich ist (Bannantine *et al.*, 2000). Der erste identifizierte Vertreter dieser Inc-Proteinfamilie ist IncA (Rockey *et al.*, 1995). Es besitzt Homologe in *C. trachomatis*, *Cp. pneumoniae*, *Cp. felis*, *C. muridarum*, *Cp. abortus* und *Cp. psittaci*, wo es in der Inklusionsmembran infizierter Zellen lokalisiert (Beeckman *et al.*, 2008). Die Proteingröße von IncA ist in *Cp. psittaci* etwa 42 kDa, in *C. trachomatis* ungefähr 35 kDa. Obwohl die Sequenzähnlichkeiten innerhalb der Homologen sehr gering sind und auch die Antikörper nicht kreuzreagieren, zeigen die IncA-Proteine einen gleichen generellen Aufbau (Delevoye *et al.*, 2004). Neben der für Inc-Proteine charakteristischen membranständigen Domäne weist IncA einen zytoplasmatischen Teil auf. Dieser macht es zu einem logischen Kandidaten für direkte Interaktionen mit eukaryotischen Wirtszellproteinen und bietet sich daher für den Einsatz im Hefe-Zweihybrid-Screening an. Einige funktionelle Eigenschaften von IncA wurden bereits beschrieben. In der zytoplasmatischen Domäne liegt ein SNARE-ähnliches Motiv, über welches IncA, wie bereits erwähnt, mit Wirtszell-SNAREs interagieren und so die Membranfusion beeinflussen kann (Delevoye *et al.*, 2008; Paumet *et al.*, 2009). IncA ist für die Entwicklung der Inklusion in infizierten Zellen von großer Bedeutung. *C. trachomatis*-Isolate, denen IncA fehlt oder bei denen IncA temperaturabhängig nicht in die Inklusionsmembran integriert wird, zeigen eine Störung in der Membranfusion (Suchland *et al.*, 2000; Fields *et al.*, 2002). Außerdem wurde beschrieben, dass IncA einerseits an den Eintrittsstellen von zytoplasmatischen Lipidtröpfchen akkumuliert (Cocchiario *et al.*, 2008). Andererseits ko-lokalisiert es auf Fasern, die in das

Wirtszellzytoplasma reichen, und am Endoplasmatischen Retikulum (ER) mit anderen chlamydialen Membranproteinen wie LPS oder MOMP (Brown *et al.*, 2002; Giles und Wyrick, 2008 ). Wird IncA überexprimiert, lagert es sich ebenfalls am ER an und blockiert bei zusätzlicher Infektion die normale Entwicklung der Inklusion (Alzhanov *et al.*, 2004). IncA spielt während der Infektion somit möglicherweise nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Fusion von Membranen und dem Eintritt von Lipidtröpfchen in das Einschlusskörperlumen, sondern auch bei der Freisetzung von Komponenten aus den Retikularkörpern und deren Transport in das Zytosol oder zum ER der Wirtszelle.

### 1.8 Ras-GTPase-aktivierendes Protein SH3-Domäne-Bindeprotein 1 (G3BP1)

Das 68 kDa große humane G3BP1 wurde erstmals von Parker *et al.* als konstitutiv exprimiertes Protein beschrieben, das mit dem Ras-GTPase-aktivierenden Protein (GAP) ko-immunopräzipitiert werden kann. G3BP1 besitzt Sequenzhomologien zu Mitgliedern der Superfamilie der heterogenen, nukleären Ribonukleoproteine (hnRNP) und weist einige Merkmale dieser Proteingruppe auf. Es besitzt zwei RNA-Erkennungsmotive (RRM - *RNA recognition motifs*) RNP1 und RNP2, eine Arginin-Glyzin-reiche Domäne (RGG) und eine saure Domäne (Parker *et al.*, 1996). Darüber hinaus hat es eine NTF2-ähnliche Domäne (*Nuclear transport factor 2*) und ein prolinreiches Motiv (P).



**Abbildung 4: Domänenstruktur von G3BP1.**

G3BP1 besitzt 466 Aminosäuren. NTF - *Nuclear transport factor*; AR - *Acid rich domain*, saure Domäne; P - prolinreiches Motiv; RRM - *RNA recognition motif*, RNA-Erkennungsmotiv; RGG - Arginin/Glyzinreiche Domäne.

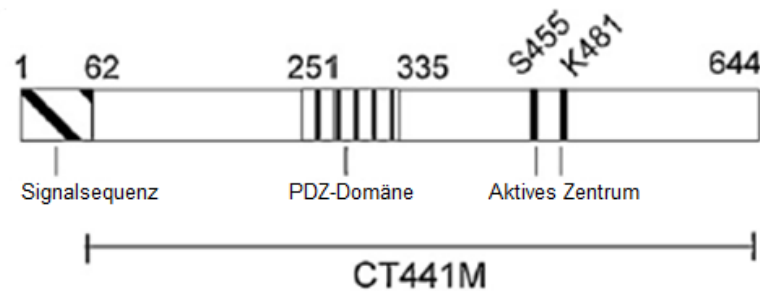
G3BP1 kommt hauptsächlich im Zytoplasma vor, es hat aber auch die Fähigkeit in den Zellkern zu gelangen. In Serum-stimulierten Hamster-Lungen-Fibroblasten ko-lokalisiert und interagiert es an der Plasmamembran mit GAP und (Kennedy *et al.*, 2001). In ruhenden Zellen ist G3BP1 hyperphosphoryliert, gelangt in den Zellkern und besitzt eine phosphorylierungsabhängige RNase-Aktivität. Dabei spaltet es *in vitro* spezifisch in der 3'-untranslatierten Region von *c-myc* mRNA (Gallouzi *et al.*, 1998; Tourriere *et al.*, 2001)

Eine weitere Form, in der G3BP1 in der Zelle vorliegen kann, sind sogenannte Stressgranula, in welchen untranslatierte mRNA und Proteine aggregieren (Tourriere *et al.*, 2003; Buchan und Parker, 2009). Außer G3BP1 gibt es noch die zwei weiteren Genprodukte G3BP2a und G3BP2b, wobei G3BP2b durch ein alternatives *Splicing* von G3BP2a entsteht (Kennedy *et al.*, 2001). Neben der Rolle von G3BP1 beim Ras-GAP-Signalweg und der Funktion als phosphorylierungsabhängige RNase wurden für die Ras-GAP-Bindeproteine viele weitere biologische Aufgaben vermutet und beschrieben (Irvine *et al.*, 2004). Beispielsweise sind sie über die Interaktion mit p53 und MDM2 (*murine double minute oncogene*), einem Negativregulator von p53, an der Zellzykluskontrolle und der Entwicklung von Krebs beteiligt (Kim *et al.*, 2007; Guitard *et al.*, 2001). G3BP2a interagiert mit I $\kappa$ B $\alpha$  und hält es selbst sowie den I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-Komplex im Zytoplasma zurück (Prigent *et al.*, 2000). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass G3BP1 mit USP10, einer Ubiquitin-spezifischen Protease, in einem De-Ubiquitylierungskomplex vorliegt und interagiert, und somit Einfluss auf die Proteininstabilität von USP10-Substraten nimmt (Soncini *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2003).

### 1.9 Die chlamydiale Protease CT441

Das chlamydiale Protein CT441 gehört zu einer Gruppe von Proteasen, welche die C-Termini ihrer Substrate erkennen und dort binden. Diese Tsp (*Tail specific proteases*) wurden bei vielen bakteriellen Pathogenen mit medizinischer Relevanz identifiziert, darunter *Borrelia*, *Escherichia*, *Helicobacter*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Salmonella* und selbstverständlich *Chlamydia* (Paetzel und Dalbey, 1997). In Chlamydien gibt es zwei dieser Proteasen, welche über das Typ-II-Sekretionssystem transloziert werden, CT441 und die bereits erwähnte, multifunktionelle Protease CPAF (Shaw *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2001). CT441 spaltet das Protein p65, ein wichtiger Regulator des NF- $\kappa$ B-Signalwegs, und beeinflusst darüber die Infektionsabwehr und Entzündungsreaktion der Wirtszelle (Lad *et al.*, 2007a; Lad *et al.*, 2007b). Das aktive Zentrum der Protease besteht aus einer Serin/Lysin-enthaltenden, katalytischen Einheit. Ein wichtiges strukturelles Merkmal von CT441 ist die PDZ-Domäne. PDZ-Domänen wurden ursprünglich als konservierte Sequenzen in den Proteinen PSD95 (*Post synaptic density*), Dlg (*Discs large*) aus *Drosophila melanogaster* und dem *Tight junction*-Protein ZO-1 (*Zonula occludentes-1*) identifiziert (Kennedy, 1995). Es sind modulare Protein-Protein-Interaktionsdomänen, die

an bestimmte Aminosäuresequenzen im C-Terminus von Tsp-Substraten binden (Gee *et al.*, 2000). Als Endoprotease kann CT441 wesentliche Rollen bei der Proteinreifung, der Modifikation oder deren Abbau spielen. Die PDZ-Domäne macht CT441 zu einem klaren Kandidaten für direkte Interaktionen mit Zielproteinen der Wirtszelle.



**Abbildung 5: Schematische Struktur der Protease CT441.**

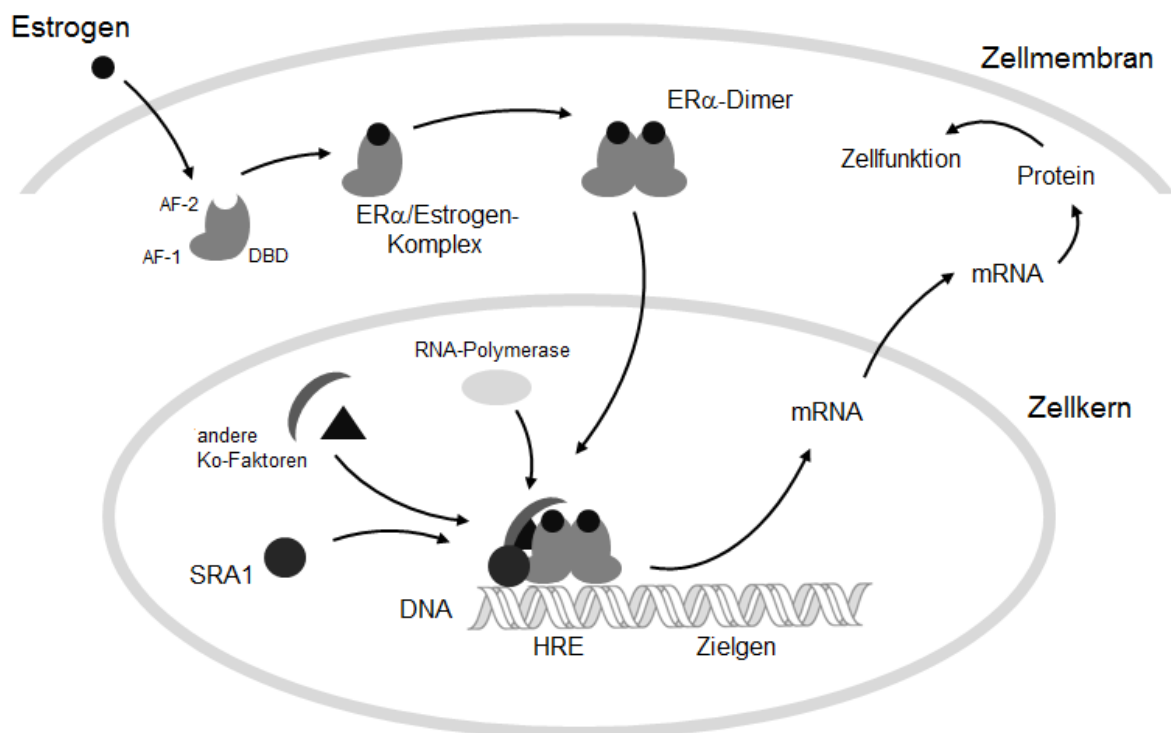
Die ungereifte Protease umfasst 644 Aminosäuren. Das aktive Zentrum besitzt die Aminosäuren Serin und Lysin. CT441M: maturierte (gereifte) Form von CT441.

### 1.10 SRA1 als Ko-Aktivator des Estrogenrezeptors $\alpha$

Estrogen beeinflusst die Physiologie vieler Gewebe sowohl bei Frauen als auch bei Männern. Im Brustgewebe kontrolliert es nicht nur die normale Entwicklung der Brustdrüse, sondern ist auch an der Förderung des Brusttumorwachstums und der Entwicklung von Brustkrebs beteiligt. Die Funktion von Estrogen wird hauptsächlich durch die beiden Estrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ) vermittelt, die zur Gruppe der Steroidrezeptoren gehören und als Ligand-abhängige Transkriptionsfaktoren wirken (Jensen und Jordan, 2003). ER $\alpha$  besitzt wie alle Steroidrezeptoren die gleiche funktionelle und strukturelle Organisation: eine variable N-terminale Region mit einer Hormon-unabhängigen Aktivierungsdomäne (AF-1), eine DNA-Bindedomäne (DBD) und eine C-terminale Ligand-abhängige Aktivierungsdomäne (AF-2) mit der Ligand-Bindungsstelle. Durch die Bindung von Estrogen erfährt der ER $\alpha$  eine Konformationsänderung, dimerisiert und gelangt in den Zellkern, wo er an genregulatorische Sequenzen, sogenannte *Hormone responsive elements* (HRE), bindet und die Transkription seiner Zielgene initiiert. Die maximale Stimulation der ER $\alpha$ -vermittelten Genexpression ist von Ko-Faktoren abhängig, die an den Rezeptor binden und die Transkription erhöhen, indem sie entweder direkt mit Transkriptionsfaktoren interagieren und/oder die Chromatinstruktur um die HRE verändern (Ellison *et al.*, 2003; McKenna und O'Malley, 2002). Einer dieser Ko-



Aktivatoren ist der Steroidrezeptor-RNA-Aktivator 1 (SRA1), von dem ursprünglich angenommen wurde, dass er als funktionelle nicht-kodierende RNA die Rezeptoraktivitäten von ER $\alpha$  und ER $\beta$  erhöht (Lanz *et al.*, 1999). SRA1 bildet dabei Komplexe mit Ribonukleoproteinen, das sind entweder Transkriptionsfaktoren oder andere assoziierte Proteinen, welche die Rezeptoraktivität positiv oder negativ beeinflussen. Interessanterweise konnte in Brustkrebszellen das endogene Protein SRAP1 detektiert werden, das sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu vorkommt. SRA1 stellt somit das erste Beispiel für eine neue Klasse von funktionellen RNAs dar, die auch für ein Protein kodieren können (Chooniedass-Kothari *et al.*, 2004; Chooniedass-Kothari *et al.*, 2006).



**Abbildung 6: SRA1 als Ko-Aktivator von ER $\alpha$ .**

Das Steroidhormon Estrogen diffundiert durch die Zellmembran und bindet im Zytoplasma an die Ligand-Bindestelle der Aktivierungsdomäne AF-2 (*activation function 2*) des Estrogenrezeptors ER $\alpha$ . Dieser wird durch eine Konformationsänderung aktiviert und erhält eine höhere Affinität zur DNA-Bindung. ER $\alpha$  dimerisiert, wandert in den Zellkern und bindet an das HRE (*hormone responsive element*) seines Zielgens. Dadurch wird die Transkription initiiert. Die Stärke der Transkriptionsaktivität hängt von Ko-Aktivatoren ab, die den ER $\alpha$ -Komplex stabilisieren. Dazu zählt auch der Steroidrezeptor-RNA-Aktivator 1 (SRA1).

### 1.11 Zielstellung dieser Arbeit

Die bisher bekannten direkten Wechselwirkungen von chlamydialen Proteinen mit Proteinen der Wirtszelle zeigen wie angepasst Chlamydien an ihre pathogene Lebensweise sind. Doch das Bild, in welchem Ausmaß sie ihren Wirt und dessen molekulare Prozesse manipulieren - ob beim Zelleintritt, bei der Nährstoffbeschaffung, der Überwindung der Immunabwehr oder der Regulation von Zellteilung und dem Überleben der Zelle - beginnt erst sich zu entwickeln. Aus diesem Grund und der Tatsache, dass Chlamydien bisher nicht genetisch manipulierbar sind, ist die Auffindung neuer Interaktionspartner chlamydialer Proteine besonders wichtig.

Es wurde gezeigt, dass Effektorproteine über das Typ-III-Sekretionssystem in das Wirtszellzytoplasma geschleust oder in die Einschlusskörpermembran eingebaut werden. Letzteres trifft auf das chlamydiale Inklusionsmembranprotein IncA aus *Cp. psittaci* zu. Seine hydrophobe, in das Zytoplasma ragende Domäne macht es zu einem logischen Kandidaten für direkte Interaktionen mit Wirtszellproteinen. Ein Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe des Hefe-Zweihybrid-Systems einen direkten Interaktionspartner von IncA zu identifizieren und die Funktion während der Infektion zu charakterisieren. Die gefundene Interaktion sollte *in vitro* und *in vivo* bestätigt werden. Darüber hinaus sollten Überexpressions- und Infektionsversuche dabei helfen, die zellulären Prozesse aufzuklären, in welche IncA über diese Interaktion eingreift.

Die Protease CT441 aus *C. trachomatis* besitzt eine Protein-Protein-Interaktionen vermittelnde PDZ-Domäne und stellt somit einen weiteren chlamydialen Effektor dar. Auch hierfür sollten im Hefe-Zweihybrid-System interagierende Proteine und damit potenzielle Substrate gefunden werden. Der Einfluss von CT441 sollte anschließend in funktionellen Versuchen charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte die PDZ-Domäne als modulare Proteininteraktionsdomäne auch einzeln betrachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Experimente sollten zeigen, welche bisher unbekannten direkten Protein-Protein-Interaktionen Chlamydien nutzen, um Einfluss auf die Wirtszelle und ihre zellulären Funktionen zu nehmen. Damit sollte ein Beitrag zu den wachsenden Erkenntnissen über die molekularen Abläufe während der chlamydialen Infektion geleistet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Allgemeines

Die verwendeten Lösungen, Puffer und Medien wurden autoklaviert (20 Minuten, 121°C, 1 bar), steril filtriert oder steril von den Herstellern bezogen. Für die Zellkultur wurden sterile Plastikmaterialien von Becton Dickinson und TPP verwendet. Für alle Arbeiten mit RNA wurde RNase-freies Material verwendet und auf die generellen Hinweise für Sauberkeit geachtet.

### 2.2 Material

#### 2.2.1 Stämme und Zelllinien

**Tabelle 2: Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
HeLa	Human; zervikales Adenokarzinom mit integriertem HPV-18 (ATCC-CCL-2)	LGC Promochem
HEp-2	Human; Larynxkarzinom mit Adenovirus und Paramyxovirus (ATCC-CCL-23)	K. Sachse, FLI Jena
HEK293	Human; embryonale Nierenzelllinie transformiert mit Adenovirus 5 DNA (ATCC-CRL-1573)	H-M. Dahse, HKI Jena

**Tabelle 3: Verwendete *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme**

Stamm	Beschreibung	Herkunft
DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> ( $r_K^- m_K^+$ ) <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1 phoA</i>	Invitrogen
HB 101	F <sup>-</sup> <i>mcrB mrr hsdS20</i> ( $r_B^- m_B^-$ ) <i>supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rspL20</i> (Sm <sup>R</sup> ) <i>xyl5<math>\lambda^-</math> leu mtl1</i>	Invitrogen
BL21-Codon plus <sup>TM</sup> -RIL	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> ( $r_B^- m_B^-$ ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal endA Hte</i> [ <i>argU ileY leuW Cam</i> <sup>R</sup> ]	Stratagene
BL21-Rosetta <sup>TM</sup> (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> ( $r_B^- m_B^-$ ) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cam <sup>R</sup> )	Merck

**Tabelle 4: Verwendete Chlamydien-Stämme**

Stamm	Bezeichnung	Herkunft
DC10	<i>C. trachomatis</i> , Serovar D	K. Sachse, FLI Jena
DC15	<i>Cp. psittaci</i> , Genotyp A	K. Sachse, FLI Jena

**Tabelle 3: Verwendete *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)-Stämme**

Stamm	Beschreibung	Herkunft
DBY747	<i>MATa</i> , <i>his3Δ</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp1-289</i>	Clontech
KFY1	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>lys2-801</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>cyh<sup>r</sup>2</i> , <i>LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-HIS3<sub>TATA</sub>-HIS3</i> , <i>URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	Clontech
Y187	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>met<sup>-</sup></i> , <i>gal80Δ</i> , <i>URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	Clontech
Y187	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>met<sup>-</sup></i> , <i>gal80Δ</i> , <i>URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i> mit humaner HeLa MATCHMAKER cDNA-Bank	Becton Dickinson
Y190	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lys2-801</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>cyh<sup>r</sup>2</i> , <i>LYS::GAL1<sub>UAS</sub>-HIS3<sub>TATA</sub>-HIS3</i> , <i>URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	Clontech
YE1	pG/ER(G), pUSΔSS-ERE	T. Munder, FH Jena

## 2.2.2 Vektoren und Plasmide

**Tabelle 4: Verwendete Vektoren und Plasmide**

Vektor/Plasmid	Beschreibung	Herkunft
<b>Allgemein</b>		
pGADT7	PT7, Zweihybridvektor, GAL4-AD	Clontech
pGBKT7	PT7, Zweihybridvektor, GAL4-BD	Clontech
pcDNA	PCMV, Expressionsvektor für Säugerzellen	Invitrogen
pcDNA3.1/ <i>myc</i> -His A	PCMV, Expressionsvektor für Säugerzellen	Invitrogen
pDsRED2-C1	PCMV, Expressionsvektor mit N-terminalem Tag	Becton Dickinson
pEGFP-C1	PCMV, Expressionsvektor mit N-terminalem Tag	Clontech
pGEX-4T-1	<i>E. coli</i> Expressionskonstrukt für GST-Fusionsprotein	Pharmacia
pCMV-BD	GAL4-DNA-BD	Stratagene
pFR-Luc	Luziferase-Reporterplasmid	Stratagene
pG/ER(G)	Estrogenrezeptor-Expressionsplasmid (Picard <i>et al.</i> , 1990)	T. Munder, FH Jena

pUSDSS-ERE	<i>LacZ</i> -Reporterplasmid, Estrogen Responsive Element (Picard <i>et al.</i> , 1990)	T. Munder, FH Jena
<b>IncA - G3BP1</b>		
DsRED-G3BP1	humanes Expressionsplasmid von G3BP1	Yuan ZM, Harvard School of Public Health, Boston
pAC5	PCR-Fragment aus pFH449, pcDNA3.1/ <i>myc</i> -His A, EcoRI/XhoI	AG Hänel, HKI
pAC19	PCR-Fragment aus pFH449, pGBKT7, NdeI/EcoRI	AG Hänel, HKI
pAC21	PCR-Fragment aus pEGFP-C1, pAC19, EcoRI/SalI	AG Hänel, HKI
pAC29	Mutationskonstrukt aus pAC21, pGBKT7	AG Hänel, HKI
pFH348	PCR-Fragment IncA-zyt. D. aus <i>C. trachomatis</i> , pGBKT7, EcoRI/BamHI	AG Hänel, HKI
pFH363	PCR-Fragment aus pFH355, pGBKT7, EcoRI/BamHI	AG Hänel, HKI
pFH366	Fragment aus pFH344, GST-Fusionsprotein, pGEX4T-1, EcoRI/XhoI	AG Hänel, HKI
pFH367	Fragment aus pFH346, GST-Fusionsprotein, pGEX4T-1, EcoRI/XhoI	AG Hänel, HKI
pFH369	Fragment aus pFH360, GST-Fusionsprotein, pGEX4T-1, EcoRI/SalI	AG Hänel, HKI
pFH370	Fragment aus pFH363, GST-Fusionsprotein, pGEX4T-1, EcoRI/SalI	AG Hänel, HKI
pFH383	PCR-Fragment, DsRED-G3BP1, pGADT7, EcoRI/SalI	AG Hänel, HKI
pFH384	PCR-Fragment, DsRED-G3BP1, GST-Fusionsprotein, pGEX4T-1, EcoRI/SalI	AG Hänel, HKI
pFH449	PCR-Fragment IncA modifiziert aus pUC57-IncAmodi, pcDNA3.1/ <i>myc</i> -His A, HindIII/XhoI	AG Hänel, HKI
pFH468	PCR-Fragment aus pAC29, pcDNA3.1/ <i>myc</i> -His A	AG Hänel, HKI
pNB4	G3BP1-Bank-Klon, pGADT7	diese Arbeit
pUC57-IncAmodi	Codon-angepasstes IncA, pUC57	Genscript
<b>CT441 - SRAP1</b>		
pAC2	Fragment aus pNB8, pcDNA3.1/ <i>myc</i> -His A, EcoRI/NotI	AG Hänel, HKI
pAC12	Fragment aus pJM2, pCEP4, HindIII/XhoI-SalI	AG Hänel, HKI
pAC20	PCR-Fragment aus pAC12, pEGFP-C1, EcoRI/SalI	AG Hänel, HKI
pFH368	PCR-Fragment CT441-PDZ aus pRK5(HA) <sub>2</sub> -CT441M, pGBKT7, EcoRI/SalI	AG Hänel, HKI
pFH379	Fragment aus pFH368, pGEX-4T-1, EcoRI/SalI	AG Hänel, HKI
pFH392	PCR-Fragment CT441M, pGBKT7, EcoRI/PstI	AG Hänel, HKI
pFH393	PCR-Fragment CT441M, GST-Fusionsprotein, pGEX-4T-1, EcoRI/NotI	AG Hänel, HKI

pFH459	PCR-Fragment NLS-PDZ aus pRK5(HA) <sub>2</sub> -CT441M, pDsRED2-C1, EcoRI/SalI	AG Hänel, HKI
pFH460	PCR-Fragment CT441-PDZ aus pRK5(HA) <sub>2</sub> -CT441M, pCEP4, HindIII/XhoI	AG Hänel, HKI
pFH470	PCR-Fragment auf pJM1, GST-Fusionsprotein, pGEX-4T-1, EcoRI/SalI	AG Hänel, HKI
pFH471	PCR-Fragment AF1 aus pG/ER(G), pCMV-GAL4-BD, EcoRI/SalI	AG Hänel, HKI
pNB6	SRAP1-Bank-Klon, pGADT	diese Arbeit
pJM1	PCR-Fragment aus pNB6, pGADT7, EcoRI/SalI	AG Hänel, HKI
pJM2	PCR-Fragment aus pJM1, p425TEF, HindIII/SalI	AG Hänel, HKI
pJM3	Fragment aus pFH368, p423TEF, EcoRI/SalI	AG Hänel, HKI
pJM5	PCR-Fragment aus pNB6 STOP, p425TEF, HindIII/SalI	AG Hänel, HKI
pRK5(HA) <sub>2</sub> -CT441M	Protease aus <i>C. trachomatis</i> LGV2	E. Li, SRI, USA

### 2.2.3 Oligonukleotide

**Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide**

Name	Sequenz
β-Aktin for	5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3'
β-Aktin rev	5'-AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA-3'
GAPDH for	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'
GAPDH rev	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'
c-myc for	5'-GCCAGAGGAGGAACGAGCT-3'
c-myc rev	5'-GGGCCTTTTCATTGTTTTC-3'

### 2.2.4 Medien

#### 2.2.4.1 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

*Lysogeny-Broth*-Medium (LB): 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 10 g/l NaCl

LB<sub>Amp</sub>-Medium: LB-Medium; 100 µg/ml Ampicillin

LB<sub>Kana</sub>-Medium: LB-Medium; 10 µg/ml Kanamycin

LB-Agar: 1,5 % (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium; pH 7,5

SOC-Medium: 2 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 10 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 2,5 mM KCl; 20 mM Glukose

#### 2.2.4.2 Medien zur Kultivierung von *S. cerevisiae*

YPD-Medium: 20 g/l Bacto-Pepton; 10 g/l Bacto-Hefeextrakt; 20 g/l Glukose

YPD-Agar: 1,5 % (w/v) Bacto-Agar in YPD-Medium

Selektions-Medium: 10 % (w/v) Yeast Nitrogen Base (YNB) w/o Amino Acids; je nach Selektion: 20 mg/l Adeninsulfat, L-Histidin-HCl, L-Methionin, L-Tryptophan, 30 mg/l L-Leucin, L-Lysin-HCl; 5 mM 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT)

Selektions-Agar: 1,5 % (w/v) Bacto-Agar in Selektions-Medium

#### 2.2.4.3 Medien zur Kultivierung von Säugerzellen

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 4,5 g/l Glukose

Zusätze für DMEM: 10 % fetales Kälberserum (FCS); 200 µg/ml Chloramphenicol

RPMI 1640 mit L-Glutamin, RPMI 1640 mit L-Glutamin ohne Phenolrot

Zusätze für RPMI: 10 % FCS oder 10% kohlegefiltertes FCS

Einfriermedium: DMEM/RPMI mit 20 % FCS und 10 % DMSO

#### 2.2.4.4 Medium zur Konservierung von Chlamydien

SPGA-Stabilisator (1l) 74,60 g Saccharose, 0,52 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,25 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,92 g L-Glutaminsäure (Na-Salz), 1 % FCS

#### 2.2.5 Lösungen und Puffer

Ammoniumpersulfat (APS) 10 % (w/v) in A. bidest.

Blocklösung 5 % Milchpulver in TBST

Bradford-Stammlösung	100 mg/l Brilliant Blau G 250; 5 % (v/v) 96 % Ethanol; 10 % (v/v) 85 % Phosphorsäure in A. bidest.
Bradford-Arbeitslösung	3 % (v/v) 96 % Ethanol; 6 % (v/v) 85 % Phosphorsäure; 6 % (v/v) Bradford-Stammlösung in A. bidest.
BSA-Lösung	1 µg/µl in A. bidest.
Comassie-Färbelösung	40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,2 % (w/v) Brilliant Blau G 250
DAPI-Stammlösung	0,1 mg/ml in A. bidest.
DEPC-A. bidest.	0,2 % (w/v) in A. bidest.
2 mM dNTP-Mix	je 20 µl aus 100 mM dATP, dTTP, dCTP und dGTP auf 920 µl
DEAB-Puffer (5x)	2,75 % (w/v) Borsäure; 2 % (v/v) 0,5 M EDTA (pH 8,0); 1,8 % (w/v) Diethanolamin
DEPC-A. bidest.	2 ml DEPC, ad. 1 l A. bidest.
Estrogen-Lösung	aufsteigende Konzentration 5 nM, 50 nM, 500 nM, 5 µM, 50 mM, 500 µM und 1 mM in Methanol
HB-Puffer	20 mM HEPES (pH 7,8); 100 mM KCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub>
HB-Igepal	0,5 % Igepal CA-630 in HB
HB-Igepal-DTT	0,5 % Igepal CA-630; 0,5 % DTT in HB
Lösung A	3 % (w/v) Ethylenglykol; 10 mM Bicin; 1 M Sorbitol
Lösung B	40 % (w/v) Polyethylenglykol 1000; 200 mM Bicin
Lösung C	150 mM NaCl; 10 mM Bicin
Lysat-Mix (Estrogen-Assay)	7,5 ml ONPG/Z-Puffer; 1,2 ml 5 % Triton X-100; 750 µl 2M Tris-HCl (pH 7,5); 206 µl 10% SDS; 250 µl β Mercaptoethanol (ME)
Lyse-Puffer ( <i>S. cerevisiae</i> )	10 mM Tris/HCl (pH8,0), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS, 2 % Triton X-100
ONPG/Z-Puffer	75 mg ONPG in 7,5 ml Z-Puffer
Paraformaldehyd	3,8 % (w/v) in PBS



PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,76 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
Protease-Inhibitoren	Aprotinin 1 mg/ml in A. bidest. Leupeptin 1 mg/ml in A. bidest. Pepstatin 1 mg/ml in Methanol PMSF 100 mM in 2-Propanol
Proteaseinhibitor-Lösung	1 mM PMSF; 10 mM DTT in PBS
Proteingelladepuffer (4x)	20 % (v/v) 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8); 2,4 % (w/v) SDS; 26 % (v/v) Glycerin; 30 % (v/v) β-Mercaptoethanol; Brilliant Blau G 250; ad. 50 ml A. bidest.
RIPA-Puffer	150 mM NaCl; 65 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1 % (w/v) Natrium Deoxycholat; 1 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (w/v) SDS
Strip-Lösung	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8); 2 % (w/v) SDS; 100 mM β-Mercaptoethanol
TFB I	30 mM K-Acetat; 50 mM MnCl <sub>2</sub> ; 100 mM KCl; 10 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15 % (w/v) Glycerin
TFB II	10 mM MOPS; 10 mM KCl; 75 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15 % (w/v) Glycerin
Tris-Glycin-Gellaufpuffer (10x)	248 mM Tris; 1,92 M Glycin; 1,5 % (w/v) SDS
Tris-Glycin-Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 0,4 % (w/v) SDS
Tris-Glycin-Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8); 0,4 % (w/v) SDS
Transferpuffer (1x)	48 mM Tris; 39 mM Glycin; 0,0375 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Methanol
TBST (10x)	200 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1,5 M NaCl; 0,1 % (v/v) Tween®20
X-GAL-Stocklösung	20 mg in 1 ml Dimethylformamid
Zelllysepuffer	150 mM NaCl; 50 mM Tris (pH 8,0); 1 % Triton X-100
Z-Puffer	16,1 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O; 5,5 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O; 0,75 g/l KCl; 0,246 g/l MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O

Z-Puffer-Mercaptoethanol	10 ml Z-Puffer, 27 µl β-Mercaptoethanol (ME)
Z-Puffer/X-GAL	10 ml Z-Puffer, 0,027 ml β-Mercaptoethanol, 0,167 ml X-GAL-Stammlösung

### 2.2.6 Chemikalien

**Becton Dickinson:** Bacto™-Trypton, Bacto™-Hefeextrakt, Bacto™-Pepton, Difco™ Yeast Nitrogen Base (YNB) w/o Amino Acids; **Calbiochem:** D(+)Glukose; **Difco:** Bacto™-Agar; **GE Healthcare:** Glutathion-Sepharose™ 4B, Protein G Sepharose™ 4Fast Flow; **Hartmann Analytic:** L-[<sup>35</sup>S]-Methionin; **Merck:** Kalziumchlorid, Magnesiumsulfat; **PAA:** DMEM mit 4,5 g/l Glukose, RPMI 1640 mit L-Glutamin mit/ohne Phenolrot, Fetales Kälberserum sterilfiltriert/kohlegefiltriert, Phosphate buffered saline (PBS); **ProTaq:** MountFluor; **Roche:** Leupeptin, Pepstatin; **Roth:** Aprotinin, Bicin, Borsäure, Brilliant Blau G 250, 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), Diethanolamin, Ethylenediamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA), Ethylenglykol, Essigsäure, Ethanol, Ethidiumbromid, Glasperlen, Glycerin, Glycin, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Milchpulver, β-Mercaptoethanol, Methanol, Natriumchlorid, o-Phosphorsäure, 2-Propanol, Polyethylenglykol 1000, Salzsäure 37 %, Sorbitol, Sodiumdodecylsulfat, Tris, Triton X-100, Tween®20; **Serva:** L-Lysin, Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); **Sigma Aldrich:** Agar, Adeninhemisulfat, 3-Amino-1,2,4-Triazol, Ammoniumpersulfat (APS), Ampicillin Natriumsalz, Bovines Serumalbumin, Chloramphenicol, Deoxynukleotid Set, Dimethylformamid, Dimethyl Sulfoxid (DMSO), HEPES, L-Histidin, Igepal CA-630, Kanamycin, L-Leucin, Manganchlorid, Magnesiumchlorid, L-Methionin, Paraformaldehyd, Sodium Deoxycholat, N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), L-Tryptophan

### 2.2.7 Größenstandards

Protein-Standards: PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas)  
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)  
BenchMark™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

DNA/RNA-Standards: Lambda DNA/Eco91I (BstEII) (Fermentas)

pBR322 DNA/AluI (Fermentas)

50 bp DNA Ladder (New England BioLabs)

Low Molecular Weight DNA Ladder (New England BioLabs)

### 2.2.8 Enzyme

Pwo-DNA-Polymerase (PeqLab)

Restriktionsendonukleasen (Fermentas)

RQ1 RNase-Free DNase (Promega)

SAWADY Taq-DNA-Polymerase (PeqLab)

SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transkriptase (Invitrogen)

Taq-DNA-Polymerase (PeqLab)

T4 DNA-Ligase (Invitrogen)

### 2.2.9 Antikörper

**Tabelle 6: Verwendete Primär-Antikörper**

Antikörper	Herkunft	Verdünnung
Maus anti- $\beta$ -Aktin	Sigma Aldrich	1:1000 (WB)
Maus anti-G3BP1	BD Bioscience	1:500 (WB), 1:200 (IF)
Maus anti-GAPDH	Santa Cruz Biotech.	1:1000 (WB)
Maus anti-HA	Santa Cruz Biotech	1:200 (WB)
Maus anti-His	Roche	1:200 (WB), 2 $\mu$ g/ml IP
Maus anti-LPS	AbD Serotec	1:200 (WB, IF)
Maus anti-c-Myc	Santa Cruz Biotech	1:200 (WB)
Maus anti-p65	Santa Cruz Biotech	1:100 (WB)
Kaninchen anti-SRAP1	Lifespan	1:200

**Tabelle 7: Verwendete Sekundär-Antikörper**

Antikörper	Herkunft	Konjugation	Verdünnung
Ziege anti-Maus IgG (H+L)	Dianova	HRP	1:10000
Ziege anti-Maus IgG (H+L)	Dianova	RRX	1:500
Ziege anti-Maus IgG (H+L)	Dianova	FITC	1:200
Ziege anti-Maus IgG (H+L)	Invitrogen	Alexa 488	1:400
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	Dianova	HRP	1:10000
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	Dianova	RRX	1:500

### 2.2.10 Kits

Beetle-Juice® Luciferase (PJK)  
 ECL Plus Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare)  
 IMAGEN™ Chlamydia (OXOID)  
 NucleoSpin® Extraction Kit (Macherey Nagel)  
 NucleoBond® Plasmid Midi Kit AX 500 (Macherey Nagel)  
 RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research)  
 RNeasy® Mini Kit (50), QIAshredder™ (50) (QIAGEN)  
 TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega)

### 2.2.11 Geräte

CO<sub>2</sub>-Brutschränke: *IG150* (Jouan), *Heracell 150* (Heraeus)  
 Elektroporator *Gene Pulser* und *Pulse Controller* (BIO-RAD)  
 Fluoreszenzmikroskop *BX51*, UV-Brenner *U-RFL-T*, Kamera *DP50*, Software *cell-D* (Olympus)  
 Geldokumentationsanlage und Software *GeneGenius* (Syngene),  
 Gelelektrophoreseapparatur horizontal (BioRad), vertikal *Minigel-Twin* (Biometra)  
 Geltrockner *MGD-4534* (VWR)  
 Inkubationswippe *WT12* (Biometra)  
 Konfokales Laser Scanning-Mikroskop *Axiovert 200 M/LSM 510 META* (Carl Zeiss)  
*Lab Dancer Digital* (VWR)  
 Laborwaage *LP620P*, Feinwaage *AC211S* (Sartorius)  
 Luminometer *Luminoskan TL Plus* (Labsystems)  
 Magnetrührer/Heizplatte *IMAK® RCT* (Janke&Kunkel)  
 Mikroskop *Axiovert25* (Carl Zeiss)  
 ND-1000 NanoDrop®, Software NanoDrop 2.4.7c  
 Netzgeräte *Power Supply 200/2.0*, *Power Pac 300* (BioRad)  
 PCR-Geräte: *Mastercycler gradient* (Eppendorf), *PTC-225* (MJ Research)

pH-Meter *pH211* (Hanna instruments)

qRT-PCR System (Applied Biosystem Stepone)

Rotator *Rotamix* RM1 (ELMI)

Scanner *ScanJet 5300C* (Hewlett Packard)

Schüttelinkubator *IS89* (Wesbart), Schüttelinkubator (Infors)

Sonifikator *Labsonic M* (Sartorius)

Spectrophotometer 20 *Genesys* (Spectronic)

Sterile Arbeitsbank *HeraSafe* (Thermo Scientific)

Sterile Werkbank *LaminAir®* HB2448 (Heraeus)

Semi-Dry Transfer Cell *Trans-Blot SD* (BioRad)

Thermomixer *5436* (Eppendorf)

Vakuumkonzentrator *5301* (Eppendorf)

*Vortex Genie* (Janke&Kunkel)

Wasserbad *GFL* (Julabo)

Zentrifugen: Biofuge *fresco* (Heraeus), Centrifuge 5702R und 5415R (Eppendorf), Sigma 4K15C (Sigma), Rotanta 460 RS (Hettich)

### **2.2.12 Filme und Filter**

Film Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL (Amersham)

Film X-OMAT<sup>TM</sup> AR, XAR 5 (Kodak)

Filterpapier (Whatman)

Optitran Transfer Membran BA-S 83 NC (Whatman)

Rotilabo®-Spitzenfilter 0,22 µm (Roth)

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Transformation von *E. coli*

#### 2.3.1.1 Herstellung von chemisch kompetenten Zellen

Der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  wurde in 10 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht auf einem Rotationsschüttler bei 180 rpm und 37 °C kultiviert. Von dieser Vorkultur wurde 1 ml in 100 ml vorgewärmtes LB-Medium mit 10 mM KCl und 20 mM MgSO<sub>4</sub> überführt. Diese Hauptkultur wurde dann für weitere 1,5 bis zwei Stunden geschüttelt bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,3. Je 50 ml wurden 10 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 15 ml TBF I gelöst. Nach einer Inkubation für 10 min auf Eis folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt unter den gleichen Bedingungen. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet in 2 ml TBF II resuspendiert. Die Zellen wurden in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße zu je 200  $\mu$ l aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

#### 2.3.1.2 Transformation von chemisch kompetenten Zellen

Die chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 1-5  $\mu$ g der Plasmid-DNA bzw. 20  $\mu$ l Ligationsansatz zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock bei 42 °C und eine Inkubation auf Eis für jeweils 2 min. Nach der Zugabe von 800  $\mu$ l LB-Medium wurden die Zellen 60 min bei 37 °C langsam geschüttelt. Von diesem Ansatz wurden 100  $\mu$ l direkt auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum gegeben. Der Rest der Zellen wurde 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert, das Zellpellet in einem kleinen Volumen des Überstandes resuspendiert und auf einer zweiten Agarplatte ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37 °C.

#### 2.3.1.3 Herstellung von elektrokompetenten Zellen

Der *E. coli* Stamm HB101 wurde für die Vorkultur in 10 ml LB-Medium angeimpft und bei 180 rpm und 37 °C über Nacht inkubiert. Daraus wurden 2 ml in 200 ml LB-Medium überführt und die Hauptkultur für etwa zwei Stunden bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 1 geschüttelt. Die Zellen wurden 15-30 min auf Eis gekühlt, zu 50 ml aufgeteilt und 15 min

bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zunächst mit 50 ml, dann mit 25 ml kaltem A. bidest. gewaschen. Anschließend wurden das Pellet in 1,25 ml 10 % Glyzerin resuspendiert und ein weiteres Mal zentrifugiert. Zuletzt wurden die Zellen in 250 µl 10 % Glyzerin aufgenommen, zu je 40 µl in gekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

#### **2.3.1.4 Transformation von elektrokompententen Zellen**

Die elektrokompententen *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-5 µg DNA gut vermischt. Der Ansatz wurde in gekühlte 2 mm-Küvetten überführt. Die Elektrottransformation erfolgte bei 25 µFD, 200 Ω und 2,5 V. Anschließend wurden die Zellen sofort mit 1 ml SOC-Medium gemischt und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 60 min bei 37 °C langsam geschüttelt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

#### **2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation)**

Von den bewachsenen LB-Agarplatten wurden die Bakterienkolonien in 1,5 ml LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 180 rpm und 37°C kultiviert. Die Kulturen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde durch vortexen gelöst und in 100 µl Resuspensionspuffer S1 (NucleoBond® Plasmid Midi Kit) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur mit 200 µl Lysepuffer S2. Anschließend wurden dem Ansatz 150 µl Neutralisationspuffer S3 zugesetzt und für 3 min auf Eis inkubiert. Es folgten ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C, die Überführung des Überstandes in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß, die Zugabe von 300 µl 2-Propanol sowie eine weitere Zentrifugation für 15 min unter den gleichen Bedingungen. Der Überstand wurde entfernt und die DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen konnte die DNA in Wasser gelöst und für den Restriktionsverdau verwendet werden.

### 2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Midi- und Maxipräparation)

Für die Präparation von größeren DNA-Mengen wurden Kulturen mit 25 ml bis 200 ml LB-Medium angeimpft. Die Isolierung erfolgte entweder mit Hilfe des NucleoBond® Plasmid Midi Kits AX500 nach Angaben des Herstellers Macherey-Nagel oder über eine LiCl-Fällung. Dafür wurde die bereits gefällte und in 300 µl A. bidest. gelöste DNA mit 300 µl LiCl für 20 min bei -20 °C inkubiert und 30 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 600 µl 96 % Ethanol versetzt, gut gemischt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 30 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Es folgte ein Waschschriff mit 70 % Ethanol, die Trocknung und die Aufnahme der DNA in A. bidest. Für RNase- und Salzfrie DNA wurde zusätzlich eine Phenol/Chloroformbehandlung durchgeführt.

### 2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Fragmente wurden in einem Volumen von 50 µl amplifiziert. Als Matrize diente entweder Plasmid- oder genomische DNA. Die *Pwo*- bzw. *Taq*-Polymerase wurde erst am Ende des initialen Denaturierungsschrittes zugegeben.

Reaktionsansatz:

0,5 µl DNA (10-20 ng)  
 2,5 µl *forward* Oligonukleotid (20 pmol)  
 2,5 µl *reverse* Oligonukleotid (20 pmol)  
 5 µl Desoxynukleotide (2mmol)  
 5 µl 10x Reaktionspuffer  
 2,5 µl DMSO  
 32 µl A. bidest.

1 U Polymerase

**Tabelle 8: PCR-Programm:**

Erstdenaturierung	96 °C	10 min	1x
Denaturierung	96 °C	1 min	30x
Oligo-Anlagerung	58-72 °C	1 min	
Synthese	72 °C	1-2 min	
Endsynthese	72 °C	10 min	1x

### 2.3.5 Gelelektrophorese, Restriktion, Ligation, und Aufreinigung von Plasmid-DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in einem 1 %igen Agarosegel versetzt mit 0,01 % Ethidiumbromid in DEAB-Puffer bei einer angelegten Spannung von 100 V. Die Restriktion, Ligation bzw. Aufreinigung erfolgten nach den Angaben der Hersteller. Die Sequenzierungen der Plasmid-DNA wurden von Eurofins MWG Operon durchgeführt.



### 2.3.6 Mutagenese mittels Fehler-PCR

Die Herstellung des Konstrukts der mutierten zytoplasmatischen Domäne von IncA aus *Cp. psittaci* erfolgte mittels Fehler-PCR wie von Schneider *et al.* beschrieben. Dafür wurde zunächst die zytoplasmatische Domäne des *Codon*-angepassten IncA (AS 121-383) PCR-amplifiziert und NdeI-EcoRI in pGBKT7 *in frame* mit dem EGFP aus pEGFP-C1 kloniert. Das resultierte GAL4-BD-IncA-EGFP-Konstrukt wurde dann als *template* für die Fehler-PCR mit den Oligonukleotiden T7SEQ und GFPprev sowie der SAWADY Taq-DNA-Polymerase verwendet. Das linearisierte GAL4-BD-EGFP-Plasmid und die zufallsbedingten PCR-Fragmente wurden in *S. cerevisiae* Y190, der das GAL4-AD-G3BP1-Bank-Plasmid enthält, ko-transformiert. Durch die hocheffiziente homologe Rekombination in Hefe entstanden aus dem linearisierten Plasmid und den PCR-Fragmenten zufällige GAL4-BD-mutIncA-Konstrukte. Die Expression der vollständigen Proteine ohne Abbrüche wurde mithilfe des EGFP im Fluoreszenz-Mikroskop überprüft. Die Fähigkeit der mutierten IncA-Proteine mit G3BP1 zu interagieren wurde im  $\beta$ -Galaktosidase Filter-*Assay* analysiert.

### 2.3.7 Transformation von *S. cerevisiae*

#### 2.3.7.1 Herstellung von kompetenten *S. cerevisiae* Zellen

Von einer YPD-Agarplatte wurde eine Kolonie in 10 ml YPD-Medium überführt und über Nacht bei 180 rpm und 30 °C kultiviert. Die Hauptkultur wurde mit 5 ml der Vorkultur in 100 ml YPD-Medium beimpft und etwa 3,5 Stunden bei 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden zu je 50 ml aufgeteilt und 5 min bei 3.000 rpm und 4 °C anzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet gelöst und in 10 ml Lösung A resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt unter den gleichen Bedingungen. Nach der Zugabe von 1 ml Lösung A und 55  $\mu$ l DMSO wurden die Zellen zu 200  $\mu$ l in gekühlte 1,5 Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

#### 2.3.7.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die gefrorenen Zellen wurden direkt mit 1-5  $\mu$ g DNA versetzt und 5 min bei 37 °C kräftig geschüttelt. Nach der Zugabe von 1 ml Lösung B wurden sie 60 min bei 30 °C inkubiert. Es folgten ein Zentrifugationsschritt für 3 min bei 3.000 rpm, die Resuspension des

Zellpellets in 1 ml Lösung C und eine weitere Zentrifugation. Der Überstand wurde bis auf einen geringen Rest entfernt. Die Zellen wurden vorsichtig gelöst und auf Selektionsagar ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte für drei Tage bei 30 °C.

### **2.3.8 Hefe-Zweihybrid-System**

Die Methode beruht auf der Beschreibung von Fields und Song, 1989. *S. cerevisiae* Y190 wurde mit dem jeweiligen pGBKT7-Plasmid zur Expression des Köderproteins transformiert. Nach 3-4 Tagen wurde dieser Stamm mit *S. cerevisiae* Y187, welcher die HeLa cDNA MATCHMAKER 3 Bank in pGADT7 exprimiert, für sechs Stunden inkubiert. Die Selektion der interagierenden Klone erfolgte auf Histidin-Mangelmedium mit dem Zusatz von 5 mM 3-AT. Wachsende Kolonien wurde auf ihre  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mittels Filter-Assay getestet (2.3.10). Die Plasmide dieser Stämme wurden isoliert (2.3.9), in *E. coli* vermehrt und zusammen mit dem jeweiligen GAL4-BD-Köder in KFY re-transformiert. Erst wenn diese Stämme erneut eine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität aufwiesen, wurden die HeLa-cDNA-Plasmide sequenziert.

### **2.3.9 Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae***

Dreimal 1,5 ml einer Übernacht-Kultur des *S. cerevisiae*-Stammes wurden anzentrifugiert und die Pellets in 200  $\mu$ l Lyse-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 0,3 g Glasperlen und 200  $\mu$ l Phenol/Chloroform wurden die Proben 2 min stark gemixt. Nach 5 min Zentrifugation wurden die Überstände vereint, mit  $\frac{1}{2}$  Volumenanteil Chloroform-Isoamylalkohol versetzt, kurz gemixt und erneut zentrifugiert. Zu der Oberphase wurden 1/10 Teil 5 M NaCl und mindestens 0,7 Teile 2-Propanol gegeben. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C wurde das Pellet dreimal mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20  $\mu$ l A. bidest. aufgenommen. 10  $\mu$ l davon wurden anschließend mittels Elektroporation in *E. coli* HB101 transformiert.

### **2.3.10 $\beta$ -Galaktosidase Filter-Assay**

Zur Vorbereitung wurde die Z-Puffer/X-GAL-Lösung frisch hergestellt. In einer leeren Petrischale wurde ein Filterpapier damit angefeuchtet. Angewachsene *S. cerevisiae*-Kulturen wurden unter leichtem Druck auf ein weiteres steriles Filterpapier übertragen.

Der Filter wurde anschließend für einige Sekunden in flüssigen Stickstoff gelegt und in die Petrischale mit dem feuchten Filter gelegt. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für einige Stunden oder über Nacht. Bei Interaktion der beiden Proteine war eine Blaufärbung erkennbar.

### **2.3.11 $\beta$ -Galaktosidase Flüssig-Assay**

Zur Quantifizierung der Galaktosidase-Aktivierung wurde ein  $\beta$ -Galaktosidase Flüssig-Assay nach Breeden und Nasmyth durchgeführt. Dafür wurde die OD<sub>600</sub> der *S. cerevisiae*-Übernacht-Kultur bestimmt. 1,5 ml dieser Kultur wurden 30 s bei 13000 rpm zentrifugiert und die Pellets einmal in Z-Puffer gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in 100  $\mu$ l Z-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden dann dreimal abwechselnd für je 1 min in flüssigen Stickstoff und bei 37 °C in ein Wasserbad gegeben. Anschließend wurden 700  $\mu$ l Z-Puffer/ME und 160  $\mu$ l Z-Puffer/ONPG (4mg/ml) zugegeben und die Proben bei 30 °C mindestens eine Stunde inkubiert. Die genaue Zeit wurde dabei festgehalten. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 400  $\mu$ l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben, die Proben wurden 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert und die Absorption bei 420 nm bestimmt. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$U = \frac{(1000 \times OD_{420})}{(t + V + OD_{600})}$$

**Formel 1: Berechnung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.**

Die Werte wurden aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen bestimmt.

### **2.3.12 Kultivierung von Zelllinien**

HEp-2- und HEK293-Zellen wurden im oben angegebenen Medium bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Sobald die Zellschicht über 80 % konfluent war, wurden die Zellen im Verhältnis von 1:5 bis 1:20 in neues Zellkulturmedium überführt.

### **2.3.13 Transfektion von Zelllinien**

#### **2.3.13.1 Transfektion mit FuGene HD**

Die Transfektion von humanen HEp-2- oder HEK293-Zellen erfolgte mit FuGene HD Transfektionsreagenz nach Angaben des Herstellers (Roche). Dabei wurden DNA und Reagenz im Verhältnis 1:2 eingesetzt. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion geerntet.

#### **2.3.13.2 Transfektion von siRNA**

Für siRNA-*Knockdown*-Versuche wurden HEp-2-Zellen mit 100 nM ON-TARGET *plus non-targeting* siRNA #1 oder ON-TARGET *plus SMART pool* G3BP1 transfiziert. Dafür wurde das Transfektionsreagenz DharmaFECT 1 nach Angaben des Herstellers verwendet (Thermo Scientific Dharmacon®). Die Zellen wurden 72 Stunden inkubiert.

### **2.3.14 Infektion von Säugerzellen**

Bei der Infektion mit Chlamydien waren die Vorgaben zum Arbeiten mit Infektionserregern der Schutzstufe L2 zu beachten.

#### **2.3.14.1 Chlamydienstammkonservierung**

Für die Konservierung von Chlamydien ist eine ausreichende Menge infektiösen Materials notwendig. Aus diesem Grund wurde eine Vorkultur aus HEp-2-Zellen infiziert und für zwei Tage inkubiert. Für *C. trachomatis* musste für die Infektion ein Zentrifugationsschritt eingefügt werden. Die Kultur wurde dann vorsichtig abgeschabt und auf weitere HEp-2-Kulturen verteilt. Nach erneuter Inkubation für zwei Tage wurde in eine der Kulturen eine geeignete Menge SPGA-Stabilisator gegeben, die Zellen wurden abgeschabt und in das nächste Kulturgefäß überführt. So wurde vorgegangen bis alle Zellen im letzten Gefäß vereinigt waren. Die Kulturflaschen wurden nach dem gleichen Prinzip noch einmal gespült. Die vereinigten HEp-2-Zellen/Chlamydien-Suspensionen wurden zu je 200 µl in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Nach 6-8 Wochen kann der Gehalt an infektiösen Chlamydien bestimmt werden.

### 2.3.14.2 Titerbestimmung

HEp-2-Zellen wurden in Schraubkappenröhrchen mit Deckglas ausgesät. Die Chlamydiensuspension wurde nach folgendem Schema verdünnt:

**Tabelle 9: Titerbestimmung von Chlamydien**

Röhrchen-Nr.	PBS-Vorlage	Inokulum	Verdünnungsstufe
1	10 ml	10 µl Original-Susp.	$10^{-3}$
2	900 µl	100 µl aus R1	$10^{-4}$
3	900 µl	100 µl aus R2	$10^{-5}$
4	900 µl	100 µl aus R3	$10^{-6}$

Das Medium der Röhrchen wurde abgesaugt und 200 µl der Zellsuspension wurden auf den Zellrasen gegeben. Die Röhrchen wurden eine Stunde bei 37 °C und 2000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde geeignetes Medium zugegeben und die Kulturen für 48 Stunden inkubiert. Für die Bestimmung des Chlamydientiters wurden die Zellen mit dem IMAGEN<sup>TM</sup> Chlamydia-Kit nach Angaben des Herstellers (OXOID) gefärbt. Es wurden bei geeigneter Verdünnungsstufe und Vergrößerung 20 Gesichtsfelder ausgezählt. Der Titer wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{EB/ml} = X \times \text{Flächenfaktor} \times \text{Verdünnungsstufe}$$

**Formel 2: Berechnung des Chlamydientiters.**

X = Anzahl Einschlusskörper;

Flächenfaktoren: 20x: 540, 40x: 2146

### 2.3.14.3 Infektion

Die subkonfluent bewachsene HEp-2-Zellkultur wurde mit *Cp. psittaci* DC15 oder *C. trachomatis* DC10 oder mit jeweils Hitze-inaktivierten Chlamydien mit einer MOI von 3 inokuliert. Nach der Zentrifugation bei 37 °C und 2000 rpm für eine Stunde wurden die Zellen wie 2.3.12 beschrieben kultiviert. Zur Inhibierung der chlamydialen Proteinsynthese wurde 200 µg/ml Chloramphenicol zu den Ansätzen gegeben. Die Zellen konnten zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet werden. Dabei wurden sie entweder für RNA-Aufreinigungen weiterverarbeitet oder in RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitoren aufgenommen um Proteinanalysen durchführen zu können.

### 2.3.15 Isolierung von RNA aus humanen Zellen

Für die RNA-Isolierung wurden  $0,5 \times 10^6$  HEp-2-Zellen in 6-Well-Schalen ausgesät und am nächsten Tag mit einer MOI von 3 infiziert. Nach 6, 24 und 48 Stunden wurden sie geerntet. Die Isolierung der RNA erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit und QIAshredder™ nach Angaben des Herstellers (QIAGEN). Die Gesamt-RNA wurde mit der RQ1 DNase (Promega) von restlicher DNA befreit und mit dem RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research) konzentriert. Anschließend erfolgte die Umschreibung von 500 ng RNA in cDNA mit der SuperScript™ II Reverse Transkriptase von Invitrogen und einem Poly dT<sub>12-18</sub> Oligonukleotid. Die cDNA wurde 1:10 verdünnt und in die semiquantitative PCR oder die *Real-Time*-quantitative-PCR eingesetzt.

### 2.3.16 Semiquantitative PCR und *Real-Time*-quantitative-PCR

Für die semiquantitative PCR wurde die cDNA als *template* und das PCR-Programm wie unter 2.3.4 beschrieben mit 25 Zyklen verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide waren *c-myc*for und *c-myc*rev sowie *GAPDH*for und *GAPDH*rev. Die PCR-Produkte wurden anschließend auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen. Die *Real-Time*-quantitative-PCR erfolgte mit dem Stepone qRT-PCR System sowie der Software von Applied Biosystem. Es wurden 2 µl der cDNA, je 0,2 µM Oligonukleotid (*c-myc* for und rev bzw. *β-Aktin* for und rev) und 18 µl Sso Fast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX (BIO-RAD) je Reaktion in eine 48-Well Reaktionsplatte pipettiert. Nach 3 min Zentrifugation bei 2000 rpm wurde die PCR gestartet. Anschließend wurden die C<sub>T</sub>-Werte von *c-myc* auf *β-Aktin* standardisiert.

**Tabelle 10: PCR-Programm *Two step***

Erstdenaturierung	95 °C	2 min	1x
Denaturierung	95 °C	5 s	40x
Synthese	62 °C	20 s	
Schmelzkurve	50-95°C	1 min	1x

### 2.3.17 Direkte und indirekte Immunfluoreszenz

HEp-2- oder HEK293-Zellen wurden in Schraubkappenröhrchen à  $0,3-1,0 \times 10^5$  Zellen ausgesät und anschließend infiziert und/oder transfiziert. Sie wurden einmal mit PBS gewaschen und für 10 min mit Paraformaldehyd fixiert. Danach wurden sie zweimal 5 min mit 0,1 M Glycin/PBS neutralisiert und mit 0,5 % NP-40/PBS für 10 min permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 % NP-40/PBS wurden die Zellen über Nacht mit 5 % FCS/ 0,1 % NP-40/PBS bei 4 °C blockiert. Die Präparate wurden dann 1,5 Stunden mit Primärantikörper (in Blocklösung) und eine Stunde mit Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Dazwischen und danach wurden sie viermal mit 0,1 % NP-40/PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden mit MountFluor auf Objektträger fixiert und mit Nagellack versiegelt.

### 2.3.18 Estrogenrezeptor-Assay in *S. cerevisiae*

Der *S. cerevisiae* Stamm YE1 mit den Plasmiden pG/ER(G) und pUCASS-ERE wurde zusätzlich mit den entsprechenden Plasmiden transformiert und auf Selektivmedium angezüchtet. Die Stämme wurden in 10 ml Medium über Nacht angezogen und ihre OD<sub>600</sub> auf ungefähr 0,3 eingestellt. 100 µl einer Kultur wurden je *Well* verwendet und mit je 2 µl Estrogen-Lösung gemischt (aufsteigende Endkonzentration: 0; 0,1; 1; 10; 100; 1000; 10000 und 20000 nM). Danach wurden die Ansätze 1,5 Stunden bei 30 °C inkubiert. Währenddessen wurde der Lysat-Mix mit dem Substrat ONPG frisch hergestellt. Davon wurden 25 µl in jedes *Well* gegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 30 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch die Zugabe von 75 µl 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> abgestoppt. Zum Schluss wurde die Absorption bei 420 nm bestimmt.

### 2.3.19 Transaktivierungs-Assay in Säugerzellen

HEK293-Zellen wurde wie in 2.3.13.1 beschrieben mit 0,5 µg pFR-*Luc* und 3 µg pCMV-*GAL4*-BD bzw. pCMV-*GAL4*-BD-ERα-AF1-Domäne transfiziert. Zusätzlich wurden entweder 3 µg pCEP4-SRAP1 oder 3 µg pRK5-(HA<sub>2</sub>)-CT441M oder beide eingebracht. Fehlende DNA-Mengen wurden mit pcDNA3.1 aufgefüllt. Dies passierte in doppeltem Ansatz. Nach 24 Stunden wurde ein Teil der Zellen mit Lysepuffer aufgeschlossen und die Gesamtproteinmenge bestimmt (siehe 2.3.20.1). Der andere Teil wurde für die Bestimmung der Luziferase-Aktivität nach Angaben des Herstellers mit dem Beetle-

Juice® Luciferase Kit weiterbehandelt. Die Werte wurden in drei unabhängig durchgeführten Versuchen bestimmt.

## **2.3.20 Expression und Analyse von Proteinen**

### **2.3.20.1 Bestimmung des Proteingehalts**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Bradford-Methode. Dafür wurde eine Eichgerade mit 1 µg/µl bis 6 µg/µl BSA in 100 µl hergestellt. Zusammen mit den zu messenden Proben wurden die Ansätze mit 900 µl Bradford-Arbeitslösung versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 595nm photometrisch bestimmt. Aus dem Anstieg der Eichgerade konnten die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt werden.

### **2.3.20.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Proteine wurden mit Gelladepuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Nach einer kurzen Abkühlzeit wurden sie auf 10-15 %ige PAA-Gele aufgetragen. Zur geoelektrophoretischen Auftrennung wurde eine Spannung von 100-150 V angelegt.

### **2.3.20.3 Western Blot**

Der Transfer der Proteine vom PAA-Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgte mittels *Semi-dry*-Blotverfahren. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde in 5 %iger Magermilch-Lösung geblockt. Nach dreimaligem Waschen für 5-10 min mit 1xTBST erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, der in Blocklösung aufgenommen war, entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht. Die Membran wurde dreimal mit 1xTBST gewaschen, für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert und nochmals gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem ECL Plus Western Blotting Detection Kit und dem Hyperfilm™ ECL.



#### **2.3.20.4 Stripping von Nitrozellulose-Membranen**

Da eine Membran oft auf mehrere Proteine überprüft werden sollte, mussten die Antikörper von der Nitrozellulosemembran entfernt werden. Dafür wurde die Strip-Lösung auf 60 °C erhitzt und auf die Membran gegeben. Nach 15 min wurde die Membran dreimal mit 1xTBST gewaschen und konnte erneut geblockt werden.

#### **2.3.20.5 Bakterielle Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen**

Eine Übernachtskultur aus 13 ml LB<sub>Amp</sub>-Medium und dem *E. coli* BL21-RIL- oder BL21-Rosetta-Stamm (transformiert mit pGEX4T-1-Vektor) wurde mit 7 ml Medium aufgefüllt und mit 25 mM IPTG induziert. Nach 1,5 bis 2 Stunden wurden die Zellen 5 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig mit 1,5 ml Proteaseinhibitor-Lösung überschichtet und sonifiziert (6x 30 s bei 0,5 Sekunden Impuls und 50 % Amplitude). Alle anschließenden Arbeiten erfolgten auf Eis. Das Lysat wurde mit 1 % TritonX-100 versetzt und 30 min bei 4 °C im Überkopftrotierer inkubiert. Anschließend wurde es 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Währenddessen wurden 120 µl Glutathion-Sepharose mit 0,5 ml Proteaseinhibitor-Lösung bei 3000 rpm gewaschen. Der Überstand des Lysats wurde auf die Sepharose gegeben und der Ansatz für eine weitere Stunde bei 4 °C rotiert. Es folgten drei Waschschriffe für 5 min bei 3000 rpm. Die Konzentration des GST-gekoppelten Proteins konnte dann bestimmt werden.

#### **2.3.20.6 In vitro-Expression von Proteinen**

Die *in vitro*-Expression von Proteinen erfolgte mittels TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) nach Angaben des Herstellers. Die radioaktive Markierung der Proteine erfolgte mit L-<sup>35</sup>S-Methionin (spezifische Aktivität: 1175 Ci/mmol; Hartmann Analytik). Die radioaktiven Reaktionsansätze konnten auf ein PAA-Gel aufgetragen und mittels Autoradiografie detektiert werden.

#### **2.3.20.7 GST-Pulldown und in vitro Interaktionsexperimente**

Die Glutathion-Sepharose mit dem gekoppelten Protein wurden mit HB-Puffer gewaschen. Da gleiche Proteinmengen eingesetzt werden mussten, konnte es Abweichungen in den Volumina geben. Diese wurden mit Glutathion-Sepharose, welche mit HB-Igepal-DTT

gewaschen worden war, ausgeglichen. Für den *Pulldown* wurden 50µl HB-Igepal und gleiche Mengen des radioaktiv markierten *in vitro* transkribierten/translatierten Proteins zugegeben und die Ansätze zwei Stunden bei 4 °C auf dem Überkopftrotierer inkubiert. Anschließend folgten mindestens fünf Waschschrte mit HB-Puffer. Die Proben wurden für die SDS-PAGE vorbereitet und aufgetrennt. Mittels Autoradiographie konnte die Bindung der radioaktiv markierten Proteine detektiert werden.

Alternativ wurde HEp-2-Zelllysate anstelle der radioaktiv markierten Proteine verwendet, das wie unter 2.3.20.8 beschrieben hergestellt wurde. Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte mittels Western Blot.

#### **2.3.20.8 Ko-Immunopräzipitation**

HEK293-Zellen wurden mit dem pcDNA3.1/*myc*-His-IncA (*Codon* angepasst) transfiziert und 24 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in einem Volumen von 500-1500 µl Lysepuffer mit Protease-Inhibitoren resuspendiert. Nach vollständiger Lyse erfolgte die Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 min. Die Zellüberstände wurden weiter verwendet. Das Lysat (1 mg Gesamtprotein) wurde auf eine mit monoklonalem His-Antikörper beladene Protein-G-Sepharose-Matrix (über Nacht bei 4 °C) gegeben und zwei Stunden auf einem Überkopftrotierer inkubiert. Für die Kontrollen wurde die Matrix mit Prä-Immunsrum behandelt oder unbehandelt verwendet. Anschließend wurde die Protein-G-Matrix fünfmal gewaschen und zuletzt in Gelladepuffer bei 95 °C aufgekocht. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Mittels Western Blot-Analyse wurde die Präzipitation von His-getaggetem IncA und G3BP1 detektiert.

### 3. Ergebnisse

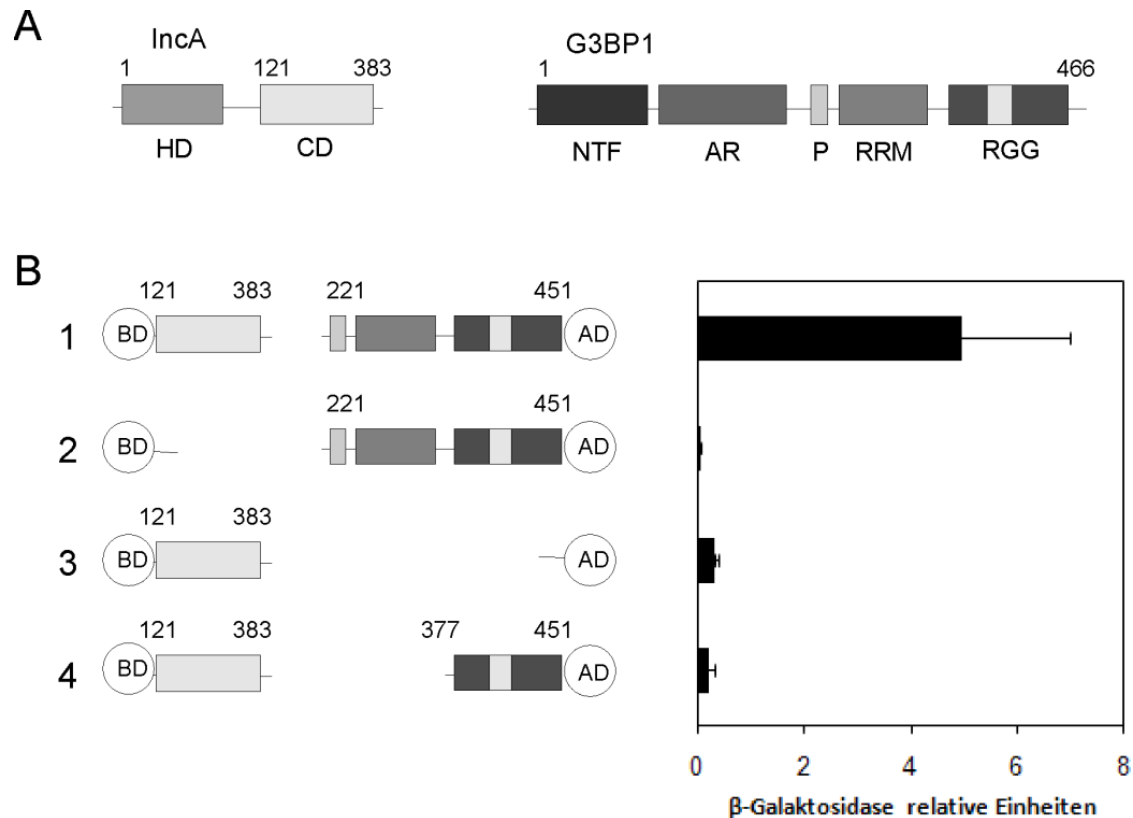
#### 3.1 Funktionelle Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Typ-III-sekretierten Protein IncA aus *Chlamydophila psittaci* und dem humanen Ras-GTPase-aktivierendes Protein SH3-Domäne-Bindeprotein 1 (G3BP1)

Als intrazelluläre Pathogene mussten Chlamydien Strategien entwickeln um verschiedene Funktionen der Wirtszelle nutzen bzw. beeinflussen zu können. Sie besitzen die Fähigkeit Wirts-interagierende Proteine zu exprimieren und diese über das Typ-III-Sekretionssystem in das Zellzytoplasma oder die Inklusionsmembran zu schleusen (Peters *et al.*, 2007). Eines dieser in die Membran eingelagerten Proteine ist IncA (Beeckman *et al.*, 2008; Delevoye *et al.*, 2004). Es besitzt eine hydrophobe Verankerungsdomäne und ein SNARE-ähnliches Motiv, über welches es mit zellulären SNARE-Proteinen interagiert und somit die Membranfusion beeinflussen kann (Delevoye *et al.*, 2008; Paumet *et al.*, 2009). Seine zytoplasmatische Domäne macht IncA zu einem logischen Kandidaten für Interaktionen mit Wirtszellproteinen. Um neue Erkenntnisse über den Pathogenitätsmechanismus von zoonotischen Chlamydien zu erlangen, wurde diese zytoplasmatische Domäne von IncA (AS 121-383) aus *Cp. psittaci* DC15 für ein Hefe-Zweihybrid-Screening verwendet.

##### 3.1.1 IncA aus *Cp. psittaci* und das humane G3BP1 interagieren im Hefe-Zweihybrid-System

Die Expression der zytoplasmatischen Domäne von IncA (AS 121-383) aus *Cp. psittaci*, fusioniert an die GAL4-Bindedomäne (GAL4-BD) im Vektor pGBKT7 in *S. cerevisiae* Y190, aktivierte keines der Reportergene *HIS3* und *lacZ* (Abbildung 7B, Säule 3). Somit konnte dieser Stamm für das Hefe-Zweihybrid-Mating mit dem Hefestamm Y187, welcher die HeLa cDNA MATCHMAKER 3 Bank fusioniert mit der GAL4-Aktivator-domäne (GAL4-AD) im pGADT7-Vektor exprimiert, verwendet werden. Die interagierenden Klone wurden auf Selektivmedium kultiviert und die überlebenden Kolonien wurden im  $\beta$ -Galaktosidase Filter-Assay auf die Aktivität des *lacZ*-Reportergens getestet. Die Plasmide von positiven Klonen wurden isoliert, aufgereinigt und sequenziert. Ein Hefeklon exprimiert den C-terminalen Teil (AS 221-451) des humanen Ras-GTPase-aktivierendes Protein SH3-Domäne-Bindeprotein 1 (G3BP1) (Abbildung 7B). Für die Quantifizierung

der Interaktion wurde der Stamm Y190, der GAL4-BD-IncA (AS 121-383) exprimiert, mit dem aufgereinigten G3BP1-HeLa-Bank-Plasmid ko-transformiert und für den  $\beta$ -Galaktosidase Flüssig-*Assay* verwendet (Abbildung 7B).



**Abbildung 7: IncA aus *Cp. psittaci* und das humane G3BP1 interagieren im Hefe-Zweihybrid-System.**

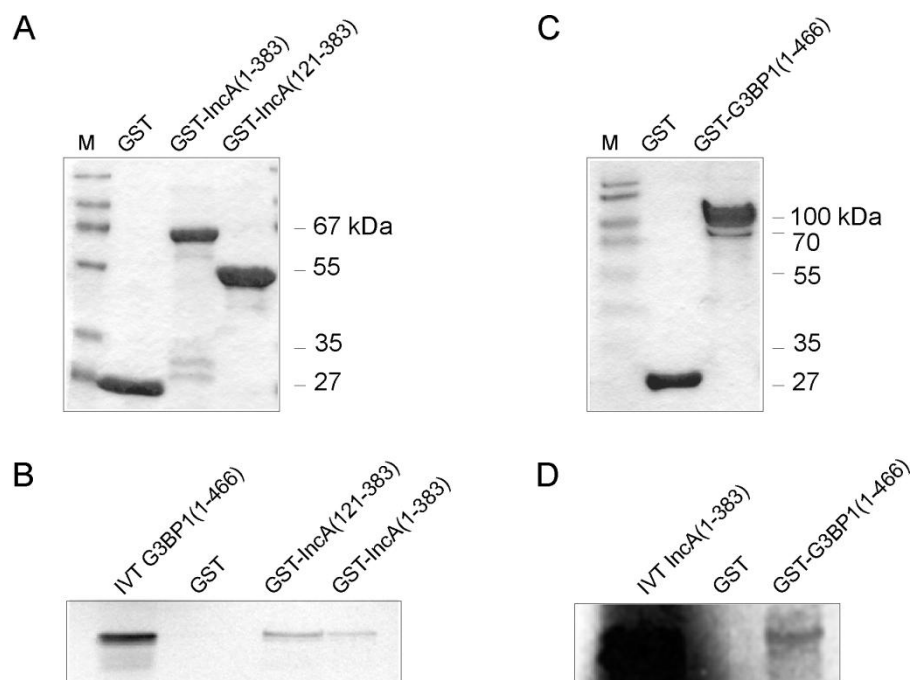
(A) Schematischer Aufbau von IncA aus *Cp. psittaci* und G3BP1. Abkürzungen: IncA: hydrophobe Domäne (HD), zytoplasmatische Domäne (CD); G3BP1: Kernlokalisierungssequenz (NTF), saure Domäne (AR), Prolin-reiches Motiv (P), RNA-Erkennungsmotive (RRM), Arginin-Glyzin-reiche Domäne (RGG). (B) Spezifische Interaktion der zytoplasmatischen Domäne (AS 121-383) von IncA aus *Cp. psittaci* fusioniert an die GAL4-DNA-Bindedomäne (BD) mit dem C-terminalen Teil des humanen G3BP1 (AS 221-451) fusioniert an die GAL4-Aktivator-domäne (AD) im  $\beta$ -Galaktosidase Flüssig-*Assay* in *S. cerevisiae* (1). Kontrollen: pGBKT7 mit GAL4-AD-G3BP1 (AS 221-451) (2) und GAL4-BD-IncA (AS 121-383) mit pGADT7 (3). Die Deletion der RNA-Erkennungssequenzen im Konstrukt GAL4-AD-G3BP1 (AS 337-451) führt zum Verlust der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität (4). Die Werte wurden in drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Es zeigt sich bei diesem Stamm eine eindeutige Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Als Kontrollen dienten Stämme, die mit den Vektoren pGBKT7 und pGADT7-GAL4-AD-G3BP1 (Säule 2) oder pGBKT7-BD-IncA (AS 121-383) und pGADT7 (Säule 3) transformiert wurden. Sie weisen keine signifikante  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität auf. Um die interagierenden Stellen von G3BP1 mit IncA eingrenzen zu können, wurde aus dem G3BP1-HeLa-Bank-Klon, der spezielle RNA-Erkennungsmotive enthält (Abbildung 7A, RRM), das Konstrukt GAL4-AD-G3BP1 (AS 377-451) ohne diese Motive hergestellt. In

Abbildung 7B, Säule 4, ist erkennbar, dass die Deletion der RRM's zu einem kompletten Verlust der Interaktion mit IncA (AS 121-383) führt. Die zytoplasmatische Domäne von IncA aus *Cp. psittaci* interagiert somit spezifisch mit dem C-terminalen Teil von G3BP1 im Hefe-Zweihybrid-System.

### 3.1.2 Die Gesamtproteine IncA aus *Cp. psittaci* und G3BP1 interagieren *in vitro*

Die direkte Interaktion der beiden Proteine IncA und G3BP1 sollten dann *in vitro* im GST-*Pulldown* nachgewiesen werden. Dafür wurden das Gesamtprotein IncA (AS 1-383), die zytoplasmatischen Domäne von IncA (AS 121-383) und GST allein im den pGEX4T-1 Vektor kloniert und im *E. coli* Stamm BL21-RIL heterolog exprimiert (Abbildung 8A).



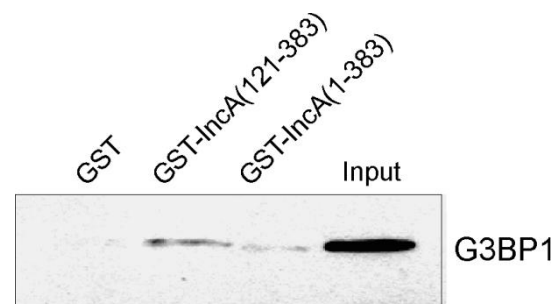
**Abbildung 8: Die Gesamtproteine IncA aus *Cp. psittaci* und G3BP1 interagieren *in vitro*.**

Coomassie-Färbung der Aufreinigungen von (A) GST, GST-IncA (AS 1-383) und GST-IncA (AS 121-383) oder (C) von GST und GST-G3BP1 (AS 1-466). (B) GST-Pulldown mit L-[<sup>35</sup>S]-Methionin-markiertem Gesamtprotein G3BP1 und den GST-Fusionsproteinen von IncA. (D) GST-Pulldown mit radioaktiv markiertem IncA (AS 1-383) und GST-G3BP1 (AS 1-466). Input: 10 µl IVT-Produkt.

Die GST-Fusionsproteine wurden anschließend an eine Glutathion-Sepharose-Matrix gebunden und mit dem L-[<sup>35</sup>S]-Methionin-markiertem *in vitro* transkribierten und translatierten Gesamtprotein G3BP1 inkubiert. Die Bindung des radioaktiv markierten G3BP1 konnte mithilfe von Autoradiografie analysiert werden (Abbildung 8). G3BP1

bindet spezifisch sowohl an das Gesamtprotein GST-IncA als auch an die zytoplasmatische Domäne GST-IncA (AS 121-383). Dagegen ist bei der Kontrolle mit der GST-Matrix keine Bindung erkennbar. Dieses Experiment wurde unter den gleichen Bedingungen, jedoch mit einer GST-G3BP1 (AS 1-466)-Matrix und radioaktiv markiertem Gesamtprotein IncA (AS 1-383) durchgeführt (Abbildung 8C und D). Auch hier zeigt sich die Bindung von L-[35S]-Methionin-IncA an GST-G3BP1, was darauf schließen lässt, dass es sich um eine direkte Interaktion handelt.

In einem zweiten Versuch wurde ein GST-Pulldown-Experiment mit HEp-2-Zelllysats anstelle von radioaktiv markiertem Protein durchgeführt. Dafür wurden wieder IncA (AS 1-383), die zytoplasmatische Domäne von IncA (AS 212-383) und GST allein aufgereinigt und mit dem Gesamtllysats von HEp-2-Zellen inkubiert. Die Proben wurden für die Western Blot-Analyse aufbereitet und die Bindung von G3BP1 mit einem Maus-Antikörper gegen endogenes G3BP1 detektiert (Abbildung 9). Sowohl für die zytoplasmatische Domäne von IncA (AS 121-383) als auch für das Gesamtprotein IncA (AS 1-383) ist die Bindung von G3BP1 nachweisbar. Dagegen ist bei der GST-Matrix keine Bindung von G3BP1 erkennbar.



**Abbildung 9: GST-Pulldown mit HEp-2-Zelllysats.**

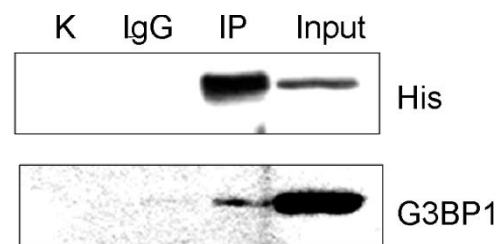
GST, GST-IncA (AS 121-383) und GST-IncA (AS 1-383) wurden an Glutathion-Sepharose gekoppelt und mit HEp-2-Zelllysats inkubiert. Im Western Blot wurde die Bindung von endogenem G3BP1 detektiert. Input: 25% des in den Pulldown-Ansätzen eingesetzten HEp-2-Gesamtllysats.

Es konnte somit gezeigt werden, dass IncA und G3BP1 *in vitro* interagieren können und, dass die zytoplasmatische Domäne von IncA ausreichend ist um G3BP1 zu binden.

### 3.1.3 *Cp. psittaci* IncA und G3BP1 interagieren *in vivo* in HEK293-Zellen

Um zu zeigen, dass die Proteine auch *in vivo* interagieren, wurden HEK293-Zellen mit einem an den humanen Codon-Gebrauch angepassten His-IncA-Expressionskonstrukt

transfiziert. Das Zelllysats wurde dann auf eine Protein-G-Sepharose-Matrix gegeben, die mit einem monoklonalen His-Antikörper beladen war. Für die Kontrollen wurde die Matrix mit Prä-Immunsersum behandelt oder unbehandelt verwendet. Abbildung 10 zeigt im Western Blot die Ko-Immunopräzipitation von endogenem G3BP1 zusammen mit dem His-getaggten IncA-Konstrukt. Damit wurde nachgewiesen, dass IncA und G3BP1 auch *in vivo* interagieren.

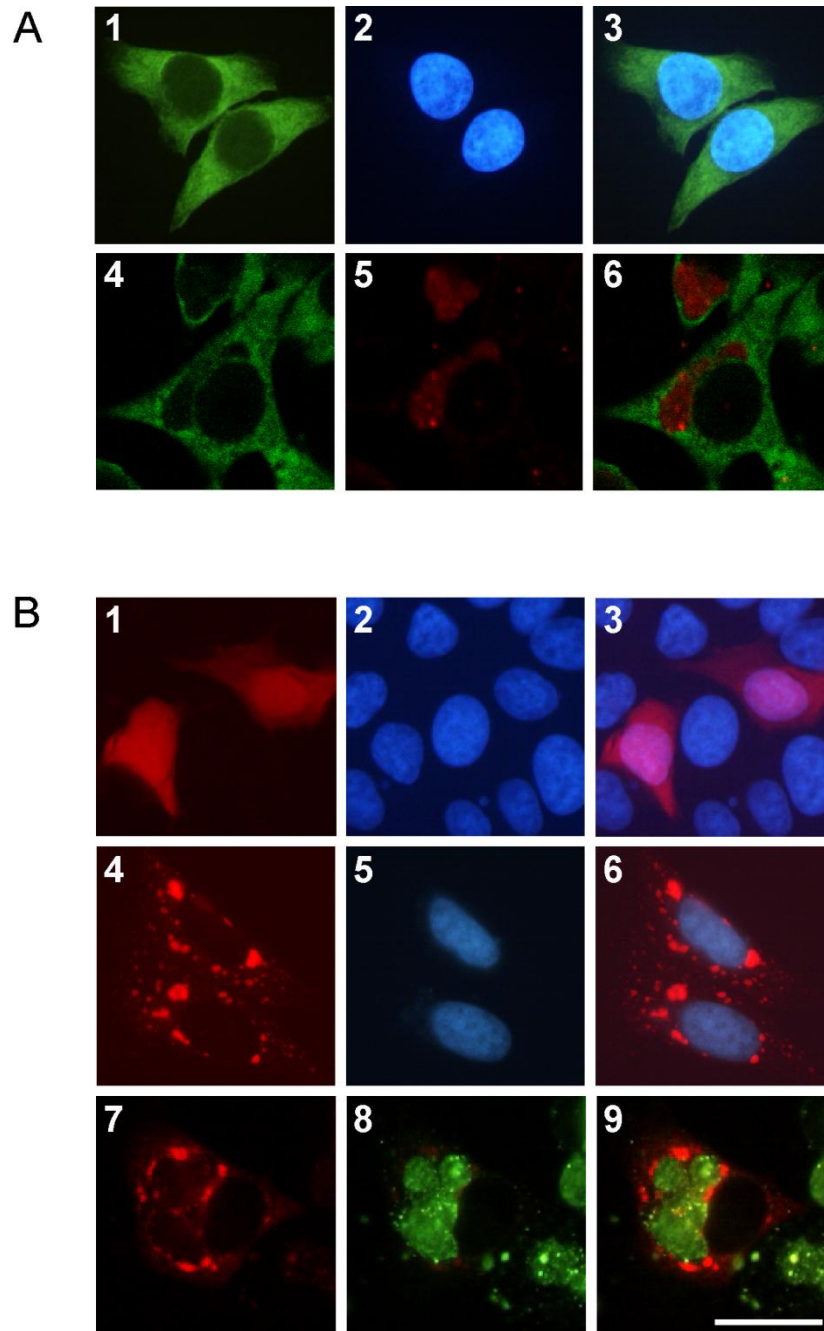


**Abbildung 10: IncA aus *Cp. psittaci* und G3BP1 interagieren *in vivo* in HEK293-Zellen.**

Western Blot des Ko-Immunopräzipitations-Experiments. Das His-getaggte IncA-Konstrukt wurde über einen monoklonalen His-Antikörper an die Matrix gebunden (oben). Endogenes G3BP1 wurde ko-immunpräzipitiert (unten, IP). Kontrollen sind die Protein-G-Sepharose allein (K) und mit Prä-Immunsersum (IgG). Input: 10% des eingesetzten Lysats.

### 3.1.4 G3BP1 akkumuliert in *Cp. psittaci*-infizierten HEp-2-Zellen um die Inklusionsmembran

Da bekannt ist, dass IncA von *Cp. psittaci* in der Einschlusskörpermembran lokalisiert (Beeckman *et al.*, 2008), sollte eine Interaktion zwischen IncA und G3BP1 zu einer Anreicherung von G3BP1 um die Inklusion führen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden *Cp. psittaci* infizierte (MOI 3) und uninfizierte HEp-2-Zellen fixiert und mit G3BP1-Antikörper und DAPI bzw. chlamydialem LPS-Antikörper inkubiert (Abbildung 11A). In nicht infizierten HEp-2-Zellen zeigt sich eine gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung von G3BP1 (Abbildung 11A, 1-3, grün), während in *Cp. psittaci*-infizierten HEp-2-Zellen ein Teil des endogenen G3BP1 um den Einschlusskörper konzentriert ist (Abbildung 11A, 4-6, Inklusion in rot). In einem weiteren Versuch wurden HEp-2-Zellen mit einem DsRED-G3BP1-Expressionskonstrukt bzw. mit einem einfachen DsRED-Vektor transfiziert (Abbildung 11B).



**Abbildung 11: G3BP1 konzentriert sich in *Cp. psittaci*-infizierten Hep-2-Zellen um die Einschlusskörper.**

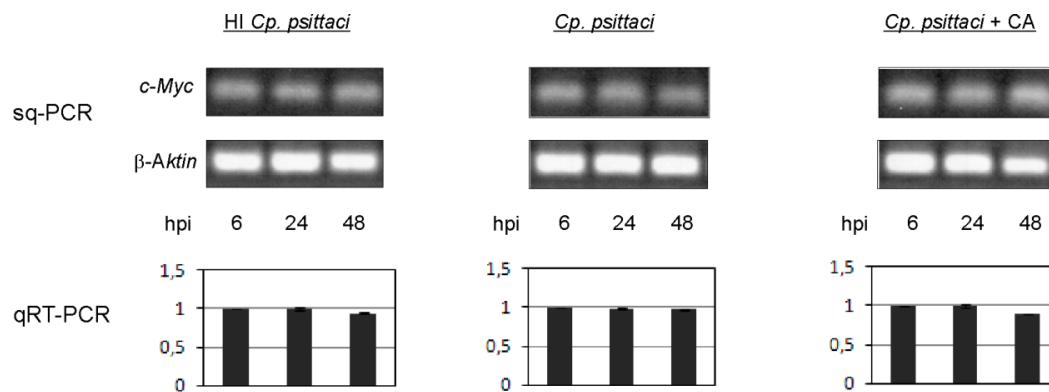
(A) Hep-2-Zellen wurden mit *Cp. psittaci* infiziert (MOI 3) oder uninfiziert nach 48 h fixiert und mit G3BP1-Antikörper (grün) und chlamydialem LPS-Antikörper (rot) bzw. DAPI (Nuklei, blau) inkubiert. Uninfizierte Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop analysiert (1-3). G3BP1 (grün) ist gleichmäßig in der Zelle verteilt. Infizierte Zellen zeigen unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop eine Konzentration von G3BP1 um die Einschlusskörper (4-6, Inklusionen in rot). Die anti-G3BP1 (1 und 4), DAPI (2) und anti-LPS (5) Signale wurden überlagert (3 und 6). (B) Hep-2-Zellen wurden mit DsRED (1-3) oder DsRED-G3BP1 (4-9) transfiziert und zusätzlich mit *Cp. psittaci* bei einer MOI von 3 infiziert (7-9). Uninfizierte Zellen wurden mit DAPI angefärbt (1-6), infizierte Zellen wurden zusätzlich mit LPS-Antikörper inkubiert (7-9). Die Analyse erfolgte im Fluoreszenzmikroskop. DsRED (1, 4, 7) und DAPI (2 und 5) bzw. anti-LPS (8) wurden überlagert (3, 6, 9). DsRED (1, rot) liegt uniform in Hep-2-Zellen, auch in den Kernen (blau) vor. In uninfizierten Hep-2-Zellen lokalisiert DsRED-G3BP1 in Stressgranula (4, rot) um die Kerne (5, blau) (6, merge). In infizierte Zellen lokalisieren die G3BP1-enthaltenden Stressgranula um den chlamydialen Einschlusskörper (9). Balken = 20 µm.



In den Kontrollzellen zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung von DsRED in der gesamten Zelle (Abbildung 11B, 1-3, rot, Kerne blau). Die Überexpression von DsRED-G3BP1 führt zur Ausbildung sogenannter Stressgranula (Tourriere *et al.*, 2003). Diese rot-fluoreszierenden, G3BP1- enthaltenden Aggregate konzentrieren sich zytoplasmatisch um den Kern (Abbildung 11B, 4-6, G3BP1-Aggregate rot, Kerne blau). Es stellte sich dann die Frage, ob durch eine zusätzliche Infektion der transfizierten HEp-2-Zellen mit *Cp. psittaci* die Stressgranula umverteilt werden. In Abbildung 11B, 7-9 ist erkennbar, dass die G3BP1-Stressgranula in den infizierten Zellen deutlich um den Einschlusskörper lokalisieren (Inklusionen grün, Überlagerung in 9). Diese Anreicherung von G3BP1 an der Inklusionsmembran spricht für die Möglichkeit der Interaktion zwischen IncA und G3BP1 in *Cp. psittaci*-infizierten Zellen.

### **3.1.5 Die Infektion von Hep2-Zellen mit *Cp. psittaci* hat keinen Einfluss auf die *c-myc* mRNA**

Wie in Kapitel 1.8 beschrieben besitzt G3BP1 eine phosphorylierungsabhängige RNase-Aktivität mit Spezifität für die 3'-untranslatierte Region der *c-myc* mRNA (Gallouzi *et al.*, 1998). Daraus ergab sich die Fragestellung, ob es eine Änderung in der Konzentration der *c-myc* mRNA und/ oder dem c-Myc-Protein in *Cp. psittaci*-infizierten Zellen gibt. Dafür wurden HEp-2-Zellen in drei verschiedenen Ansätzen mit *Cp. psittaci* bei einer MOI von 3 infiziert. Die HEp-2-Zellen wurden mit infektiösem Material des DC15-Stamms inokuliert oder als Kontrollen mit Hitze-inaktivierten Zellen bzw. nach der Infektion zur Hemmung der chlamydialen Proteinsynthese mit Chloramphenicol behandelt. An verschiedenen Zeitpunkten der Infektion wurden die Zellen geerntet, die Total-RNA aufgereinigt und in cDNA umgeschrieben. Die Expressionslevel der *c-myc* mRNA und der  $\beta$ -*Aktin* mRNA als Standard wurden mittels semiquantitativer PCR und Auftrennung im Agarosegel dargestellt (Abbildung 12, oben). Es zeigt sich keine Veränderung in der Konzentration der *c-myc* mRNA im Vergleich zum  $\beta$ -*Aktin*-Standard. Um genauere Daten zu erhalten, wurden die gleichen Proben für die *Real-Time*-quantitative-PCR mit *GAPDH* als interner Standard verwendet (Abbildung 12, unten). Auch hier kann im Verlauf der Infektion keine Veränderung in der Konzentration der *c-myc*-mRNA der infizierten HEp-2-Zellen im Vergleich zu den Kontrollansätzen gemessen werden.

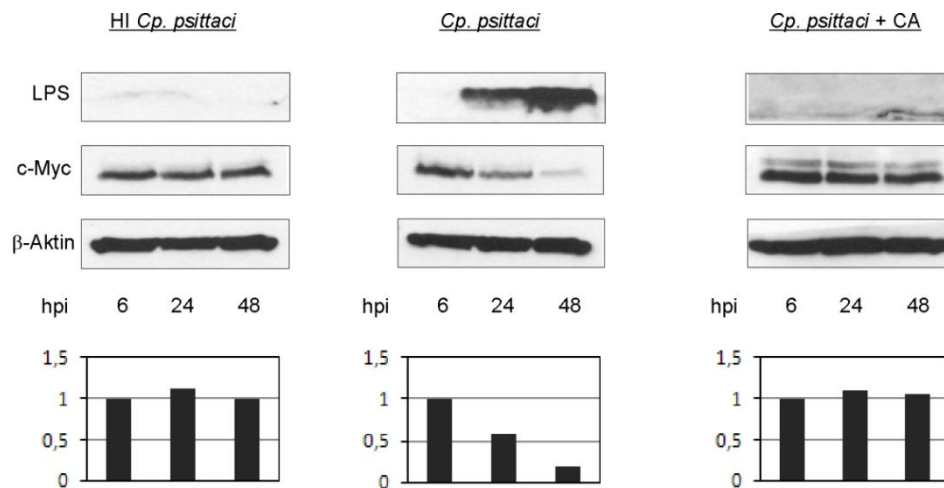


**Abbildung 12: Die *c-myc* mRNA wird in HEP-2-Zellen durch die Infektion mit *Cp. psittaci* nicht beeinflusst.**

Ergebnisse der semiquantitativen PCR auf *c-myc* und  $\beta$ -Aktin mRNA (oben) und der quantitativen *Real-Time*-PCR mit Standardisierung auf *GAPDH* (unten). HEP-2-Zellen wurden mit *Cp. psittaci* DC15 bei einer MOI von 3 infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion geerntet (Mitte). Als Kontrolle wurden die Zellen mit Hitze-inaktivierten Chlamydien (HI, links) oder zusätzlich mit Chloramphenicol (CA) behandelt (rechts). Die qRT-PCR-Diagramme zeigen die Werte von drei Experimenten. hpi = Stunden *post infection*.

### 3.1.6 Die Infektion von Hep2-Zellen mit *Cp. psittaci* führt zu einer Abnahme der c-Myc Proteinkonzentration

Parallel zur Total-RNA wurden auch Proteinlysate der infizierten Zellen gewonnen, für Western Blot-Experimente aufbereitet und auf c-Myc, chlamydiales LPS und  $\beta$ -Aktin detektiert (Abbildung 13). Dabei zeigt sich in den Lysaten der infizierten HEP-2-Zellen mit voranschreitender Infektionsdauer eine Abnahme der c-Myc-Proteinkonzentration (Abbildung 13, Mitte). In HEP-2-Zellen, die mit Hitze-inaktivierten *Cp. psittaci* DC15 inokuliert wurden, zeigt sich keine Veränderung (Abbildung 13, links). Die Abnahme der c-Myc-Konzentration ist abhängig von der chlamydialen Proteinsynthese, denn auch bei infizierten HEP-2-Zellen, welche mit Chloramphenicol behandelt wurden, ist keine Abnahme des Proteins detektierbar (Abbildung 13, rechts). Zur Quantifizierung dieser Ergebnisse wurde die c-Myc-Proteinkonzentration auf die Konzentration von  $\beta$ -Aktin standardisiert und grafisch dargestellt (Abbildung 13, unten). Die Infektion von HEP-2-Zellen mit *Cp. psittaci* führt also zur Abnahme der c-Myc-Proteinkonzentration in der Wirtszelle mit fortschreitender Infektionszeit.



**Abbildung 13: Die c-Myc-Proteinkonzentration nimmt in *Cp. psittaci*-infizierten HEp-2-Zellen ab.**

HEp-2-Zellen wurden mit *Cp. psittaci* infiziert (MOI 3) (Mitte), mit Hitze-inaktiviertem DC15 (HI, links) und zusätzlich zur Infektion mit Chloramphenicol (CA) behandelt (rechts). An verschiedenen Zeitpunkten der Infektion wurden die Proteine gewonnen, im SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-LPS, anti c-Myc und anti-β-Aktin Antikörper detektiert (oben). Die c-Myc-Proteinkonzentration wurde standardisiert auf β-Aktin quantifiziert (unten).

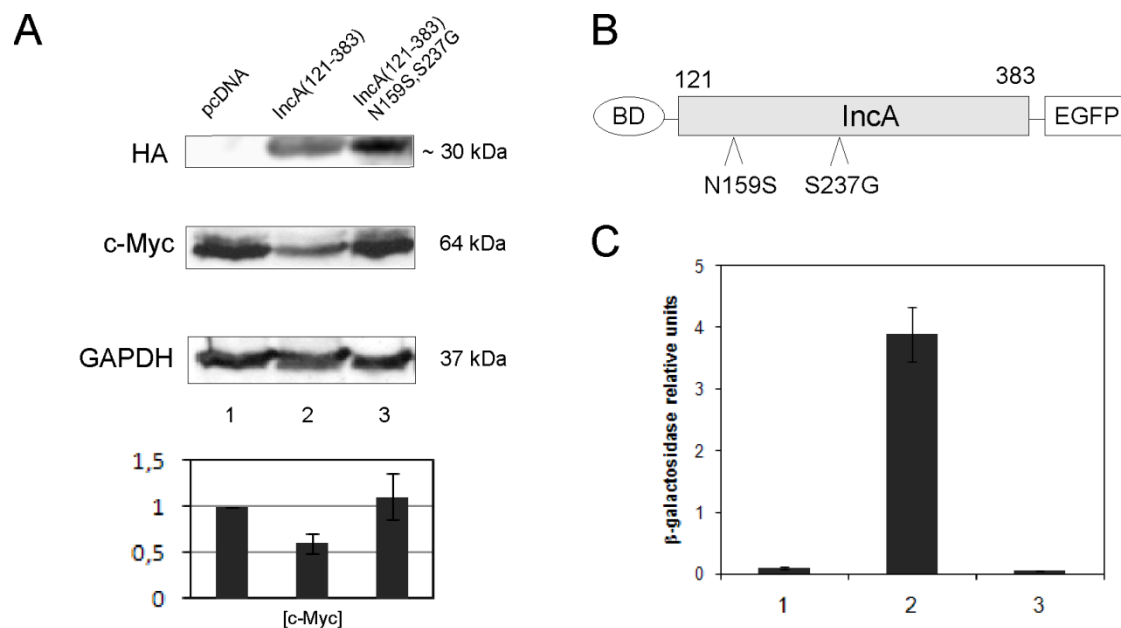
### 3.1.7 Die Abnahme der c-Myc-Proteinkonzentration kann der Interaktion zwischen IncA und G3BP1 zugeschrieben werden

Um zu zeigen, dass die Abnahme der c-Myc-Proteinkonzentration während der Infektion von humanen Zellen mit *Cp. psittaci* im Zusammenhang mit der Interaktion zwischen IncA und G3BP1 steht, wurden Expressionsexperimente in humanen HEK293-Zellen durchgeführt.

#### 3.1.7.1 Die c-Myc-Proteinkonzentration in HEK293-Zellen wird durch die Überexpression der zytoplasmatischen Domäne von IncA vermindert, jedoch nicht durch die mutierte Domäne

HEK293-Zellen wurden mit einem HA-getaggten Konstrukt der zytoplasmatischen Domäne von IncA (AS 121-383) aus *Cp. psittaci* oder, als Kontrolle, mit dem Leervektor transfiziert (Abbildung 14A). Im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 14A, Bahn 1) führt die Überexpression des HA-IncA (AS 121-383)-Konstrukts zu einer Abnahme der c-Myc-Proteinkonzentration in der gleichen Weise, wie es während der Infektion von HEp-2-Zellen mit *Cp. psittaci* zu erkennen ist (Abbildung 14A, Bahn 2). Von der Hypothese ausgehend, dass die Verringerung der c-Myc-Konzentration auf die Rekrutierung von G3BP1 an den zytoplasmatischen Teil von IncA in infizierten Zellen zurück zu führen ist,

wurde ein mutiertes IncA (AS 121-383)-Konstrukt hergestellt (Abbildung 14B). Die Mutagenese erfolgte mittels Fehler-PCR in *S. cerevisiae* (siehe 2.3.5) und resultierte in einer Doppelmutante IncA (AS 121-383)-(N159S,S237G). Die Expression des vollständigen Mutantenproteins (ohne Abbrüche oder STOP-Codons) wurde in *S. cerevisiae* nachgewiesen, indem in das Plasmid pGBKT7-GAL4-BD-IncA (AS 121-383)-(N159S,S237G) C-terminal ein EGFP fusioniert und die Expression im Fluoreszenzmikroskop überprüft wurde (nicht gezeigt). Während mit dem Ursprungskonstrukt von IncA (AS 121-383)-EGFP im Hefe-Zweihibrid-System eine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität messbar ist (Abbildung 14C, Säule 2), ist diese Mutante nicht mehr in der Lage mit G3BP1 zu interagieren (Abbildung 14C, Säule 3). Für die Negativkontrolle wurde pGBKT7-GAL4-BD-IncA (AS 121-383)-EGFP und der pGADT7-Vektor ohne G3BP1 verwendet (Abbildung 14C, Säule 1). Die Expression des mutierten IncA (AS 121-383)-(N159S,S237G)-Konstrukts in einem humanen Expressionsvektor in HEK293-Zellen hat keinen Einfluss auf die c-Myc-Proteinkonzentration (Abbildung 14A, Bahn 3).

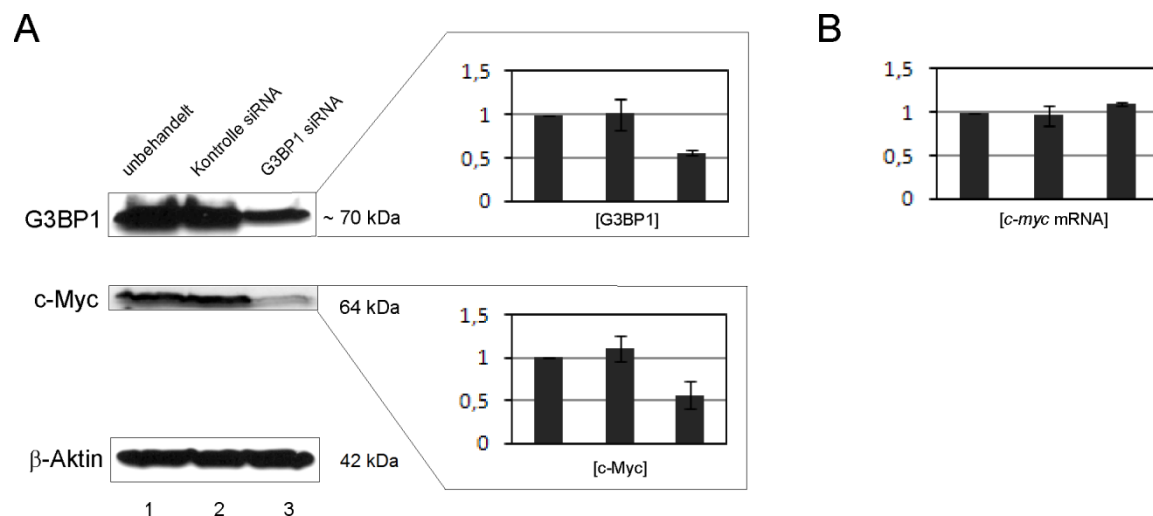


**Abbildung 14: Einfluss der Expression von IncA und einer IncA-Mutante auf die c-Myc-Proteinkonzentration in HEK392-Zellen.**

(A) Western Blot der Gesamtzelllysate von HEK293-Zellen transfiziert mit pcDNA3 (1), pcDNA3-HA-IncA (AS 121-383) (2) und pcDNA3-HA-IncA (AS 121-383)-(N159S, S237G) (3). Detektion mit anti-HA, anti-c-Myc und anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper. Die Quantifizierungsdaten zeigen die c-Myc-Proteinkonzentration im Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin und ergeben sich aus drei unabhängigen Experimenten. (B) Schematische Darstellung des mutierten IncA (AS 121-383)-(N159S, S237G)-Konstrukts, das im Hefe-Zweihibrid-System nicht mit G3BP1 interagiert. (C) Hefe-Zweihibrid-Assay der IncA-Konstrukte mit G3BP1. Gezeigt sind die Werte des  $\beta$ -Galaktosidase Flüssig-Assay von GAL4-BD-IncA (AS 121-383)-EGFP mit pGADT7 (1), GAL4-BD-IncA (AS 121-383)-EGFP mit GAL4-AD-G3BP1 (AS 221-451) (2) und GAL4-BD-IncA (AS 121-383)-(N159S, S237G)-EGFP mit GAL4-AD-G3BP1 (AS 221-451) (3) in *S. cerevisiae* aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3.1.7.2 Der siRNA-*Knockdown* von G3BP1 in HEK293-Zellen führt zur Abnahme der c-Myc-Proteinkonzentration

Da angenommen wird, dass die Rekrutierung von G3BP1 an die Oberfläche der Einschlusskörper durch IncA für die Abnahme der c-Myc-Proteinkonzentration verantwortlich ist, sollte ein siRNA-vermittelter *Knockdown* von G3BP1 den gleichen Effekt haben. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden HEp-2-Zellen mit einem *Pool* von vier verschiedenen siRNAs, welche spezifisch für G3BP1 sind, transfiziert und im Western Blot auf Veränderungen der G3BP1- und c-Myc-Proteinkonzentration analysiert (Abbildung 15A). Als Kontrollen dienten unbehandelte HEp-2-Zellen sowie Zellen, die mit nicht zielgerichteter siRNA transfiziert wurden. Wie erwartet, führt eine Abnahme von G3BP1 um etwa 50 % zu einer vergleichbaren Regulierung der c-Myc-Proteinkonzentration, während bei den Kontrollzellen keine Veränderung erkennbar ist. Parallel wurde bei diesem Versuch RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und für die *Real-Time-PCR* verwendet. Es zeigt sich, wie auch bei der Infektion der HEp-2-Zellen mit *Cp. psittaci* keine Veränderung im *c-myc* mRNA-Level.



**Abbildung 15: Einfluss des siRNA-*Knockdowns* von G3BP1 auf die c-Myc-Proteinkonzentration und *c-myc* mRNA.**

(A) Western Blot der Gesamtzelllysate von HEp-2-Zellen unbehandelt (1), transfiziert mit nicht zielgerichteter siRNA (2) und transfiziert mit ON-TARGET G3BP1 siRNA *Pool*. Detektion auf G3BP1, c-Myc und β-Aktin. Die Diagramme zeigen die Proteinkonzentrationen von G3BP1 bzw. c-Myc standardisiert auf β-Aktin. (B) qRT-PCR Experiment auf *c-myc* mRNA standardisiert mit *β-Aktin* mRNA. Die Versuche wurden dreifach durchgeführt.

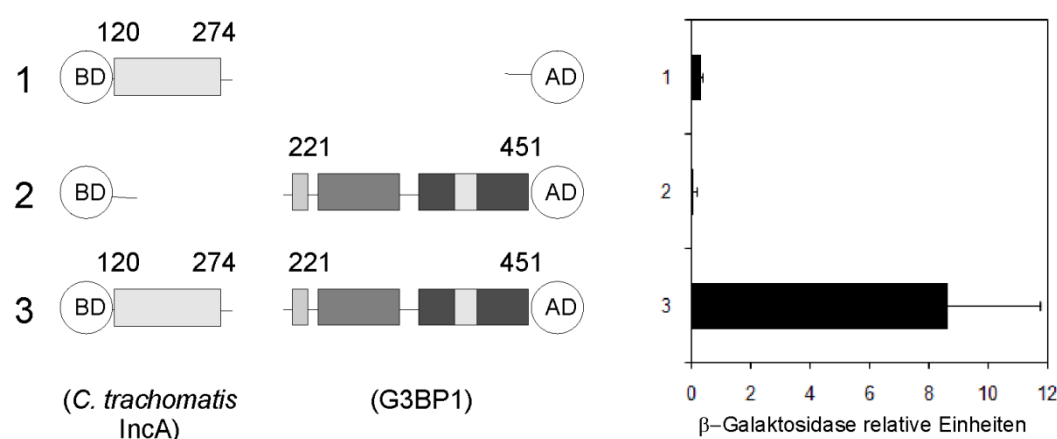
Zusammen mit den Ergebnissen der Infektionsversuche von HEp-2-Zellen mit *Cp. psittaci* und der Überexpression von IncA (AS 121-383) in HEK293-Zellen kann aus diesen Resultaten ein Zusammenhang zwischen der Interaktion von IncA aus *Cp. psittaci* mit humanem G3BP1 und der Abnahme der c-Myc-Proteinkonzentration gestellt werden.

### 3.2 IncA aus *Chlamydia trachomatis* interagiert mit G3BP1

Trotz sehr geringer Homologien in den Aminosäuresequenzen der IncA-Proteine von verschiedenen Arten der *Chlamydiaceae* weisen die IncA-Proteine von *Cp. psittaci* und *C. trachomatis* die gleichen biochemischen Eigenschaften auf (Delevoye *et al.*, 2004). Sie besitzen beide eine 50-80 Aminosäuren umfassende hydrophobe Domäne, über welche sie in der Membran des Einschlusskörpers verankert sind, und eine C-terminale Domäne, die in das Zytoplasma der Wirtszelle ragt. Trotzdem sind Antikörper gegen die IncA-Proteine von *Cp. psittaci* und *C. trachomatis* nicht kreuzreaktiv (Bannantine *et al.*, 2000; Rockey *et al.*, 1997). Beide IncA-Proteine besitzen auch die gleiche funktionelle Eigenschaft, über die Interaktion mit SNARE-Proteinen die homotypische Vesikelfusion zu beeinflussen (Delevoye *et al.*, 2008; Hackstadt *et al.*, 1999). Aus diesen Gründen sollte überprüft werden ob IncA aus *C. trachomatis* ebenfalls mit G3BP1 interagiert.

#### 3.2.1 IncA aus *C. trachomatis* und G3BP1 interagieren im Hefe-Zweihybrid-System

Wie auch bei *Cp. psittaci* IncA wurde die zytoplasmatische Domäne von IncA aus *C. trachomatis* (AS 120-274) fusioniert mit GAL4-BD in den Vektor pGBKT7 kloniert und in *S. cerevisiae* Y190 auf Selbstaktivierung getestet. Dabei wurde keines der Reportergene aktiviert (Abbildung 16, Balken 1). Die Ko-Expression von AD-G3BP1 (AS 221-451) führte zu einer signifikanten Zunahme der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität (Abbildung 16, Balken 3).

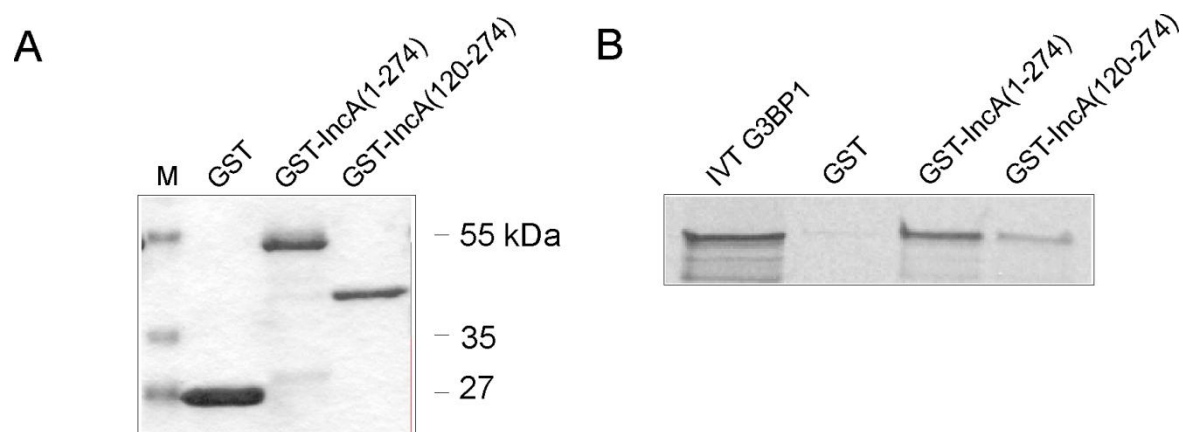


**Abbildung 16: IncA aus *C. trachomatis* interagiert mit G3BP1 im Hefe-Zweihybrid-System.**

Spezifische Interaktion der zytoplasmatischen Domäne (AS 120-274) von IncA aus *C. trachomatis* fusioniert an die GAL4-DNA-Bindedomäne (BD) mit dem C-terminalen Teil des humanen G3BP1 (AS 221-451) fusioniert an die GAL4-Aktivator-domäne (AD) im  $\beta$ -Galaktosidase Flüssig-Assay in *S. cerevisiae* (3). Kontrollen: GAL4-BD-IncA (AS 120-274) mit pGADT7 (1) und pGBKT7 mit GAL4-AD-G3BP1 (AS 221-451) (2). Die Werte wurden in drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

### 3.2.2 IncA aus *C. trachomatis* und G3BP1 interagieren *in vitro*

Um die direkte Interaktion der beiden Proteine nachzuweisen, wurden ebenfalls wie für *Cp. psittaci* beschrieben GST, GST-IncA (AS 1-274) und GST-IncA (AS 120-274) aufgereinigt (Abbildung 17A) und mit L-[<sup>35</sup>S]-Methionin-markiertem *in vitro* transkribierten und translatierten G3BP1 inkubiert und die Bindung von G3BP1 mittels Autoradiografie analysiert (Abbildung 17B).



**Abbildung 17: IncA aus *C. trachomatis* interagiert direkt mit G3BP1 *in vitro*.**

(A) Coomassie-Färbung der Aufreinigungen von GST, GST-IncA (AS 1-274) und GST-IncA (AS 120-274). (B) GST-Pulldown mit L-[<sup>35</sup>S]-Methionin-markiertem Gesamtprotein G3BP1 und den GST-Fusionsproteinen von IncA. Input: 10 µl IVT-Produkt.

Sowohl bei dem Gesamtprotein IncA als auch bei der zytoplasmatischen Domäne kann die direkte Interaktion mit G3BP1 nachgewiesen werden. Bei der GST-Kontrolle ist keine Bindung von G3BP1 erkennbar. Es konnte somit gezeigt werden, dass, trotz der geringen Homologie zwischen den IncA-Proteinen, IncA aus *C. trachomatis* spezifisch mit G3BP1 sowohl im Hefe-Zweihybrid-System als auch *in vitro* interagiert.

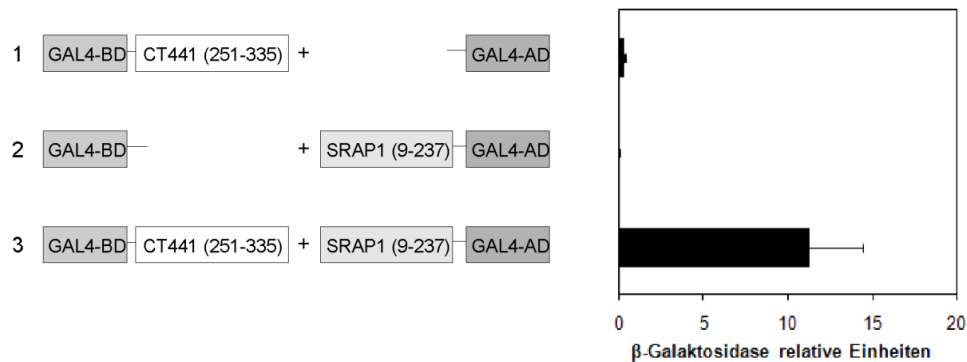
### 3.3 Die Protease CT441 aus *C. trachomatis* interagiert mit dem humanen Steroidrezeptor $\alpha$ aktivierenden Protein SRAP1

Die Protease CT441 ist ebenfalls ein chlamydiales Protein, das Wirtsproteine erkennen und durch deren Abbau in zelluläre Prozesse des Wirtes eingreifen kann. Sie spaltet das Protein p65, welches ein wichtiger Regulator des NF- $\kappa$ B Signalweges bei der Entzündungsreaktion ist. Während einer chlamydialen Infektion kann durch einen solchen Abbau die Immunantwort des Wirtes gehemmt werden (Lad *et al.*, 2007b). CT441 besitzt als strukturellen Baustein eine PDZ-Domäne. Diese Domänen können direkte Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, indem sie an bestimmte Aminosäuresequenzen der Zielproteine binden (Gee *et al.*, 2000). Um mögliche Interaktionspartner und potenzielle Substrate von CT441 aus *C. trachomatis* zu identifizieren, wurde die PDZ-Domäne (AS 251-335) mit der GAL4-DNA-Bindedomäne (GAL4-BD) im pGBKT7-Vektor fusioniert und in einem Hefe-Zweihybrid-Screening als Köderprotein eingesetzt.

#### 3.3.1 Die PDZ-Domäne von CT441 interagiert mit SRAP1 im Hefe-Zweihybrid-System

Die Expression des GAL4-BD-PDZ-Konstruktes in *S. cerevisiae* Y190 aktivierte keines der Reportergene *HIS3* und *lacZ* (Abbildung 18, Balken 1). Somit konnte dieser Stamm für das Hefe-Zweihybrid-Mating mit dem Hefestamm Y187 verwendet werden. Ein Hefeklon exprimiert den C-terminalen Teil (AS 9-237) des Steroidrezeptor-RNA-Aktivatorproteins 1 (SRAP1). Um diese Interaktion zu quantifizieren, wurde der Stamm Y190, der entweder das GAL4-BD-PDZ-Konstrukt oder nur die GAL4-BD exprimiert, mit dem SRAP1-HeLa-Bank-Plasmid ko-transformiert und für den  $\beta$ -Galaktosidase Flüssig-Assay verwendet (Abbildung 18). Im Vergleich zu den Kontrollstämmen mit GAL4-BD-PDZ (AS 251-335) und GAL4-AD (Balken 1) oder GAL4-BD und GAL4-AD-SRAP1(AS 9-237) (Balken 2) zeigt sich eine signifikante Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in dem Stamm, der GAL4-BD-PDZ (AS 251-335) und GAL4-AD-SRAP1 (AS 9-237) ko-exprimiert (Balken 3). Somit konnte gezeigt werden, dass die PDZ-Domäne von CT441 im Hefe-Zweihybrid-System spezifisch mit dem C-terminalen Teil des humanen SRAP1 interagiert.



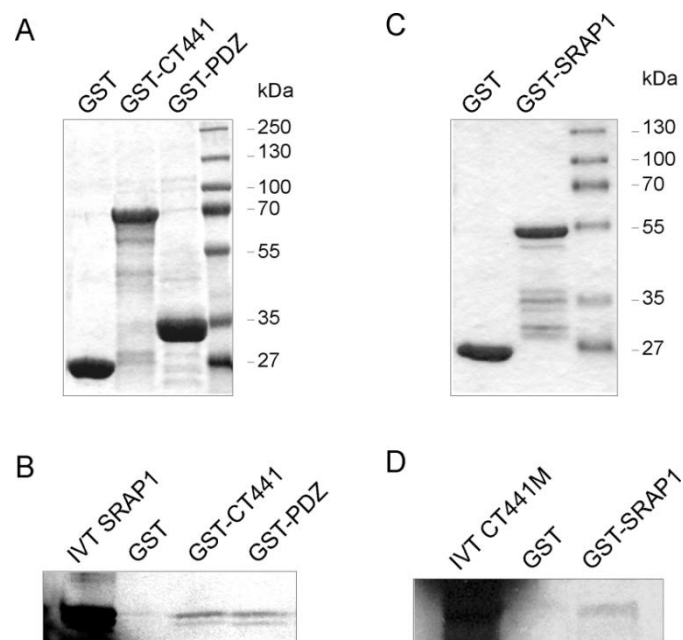


**Abbildung 18: Die PDZ-Domäne von CT441 interagiert mit SRAP1 im Hefe-Zwei-Hybrid-System.**

Spezifische Interaktion der PDZ-Domäne fusioniert an die GAL4-DNA-Bindedomäne (BD) mit dem C-terminalen Teil (AS 9-237) des humanen SRAP1 fusioniert an die GAL4-Aktivator-domäne (AD) in *S. cerevisiae* (3). Kontrollen: GAL4-BD-PDZ mit pGADT7 (1) und pGBKT7 mit GAL4-AD-SRAP1 (AS 9-237) (2). Die Quantifizierung der Interaktion erfolgte durch einen β-Galaktosidase Flüssig-Assay. Die Werte wurden in drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

### 3.3.2 CT441 interagiert mit SRAP1 *in vitro*

Im nächsten Schritt sollte die direkte Interaktion von CT441 und SRAP1 *in vitro* im GST-Pulldown nachgewiesen werden. Dafür wurde die GST-fusionierte komplette Protease CT441 (AS 62-644), GST-PDZ (AS 251-335) oder GST allein an eine Glutathion-Sepharose-Matrix gebunden (Abbildung 19A) und mit dem L-[<sup>35</sup>S]-Methionin-markiertem *in vitro* transkribierten und translatierten Protein SRAP1 inkubiert.



**Abbildung 19: CT441 und SRAP1 interagieren *in vitro*.**

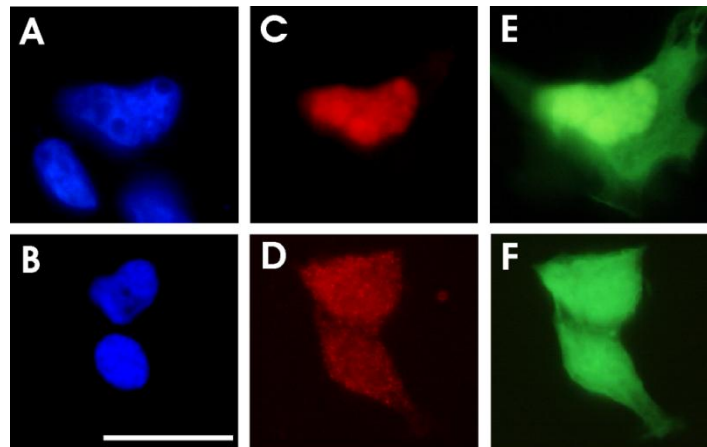
(A) Coomassie-Färbung der Aufreinigungen von GST, GST-CT441 und GST-PDZ oder (C) von GST-SRAP1. (B) Ergebnisse der GST-Pulldown-Experimente, bei welchen L-[<sup>35</sup>S]-markiertes SRAP1 eingesetzt wurde oder (D) L-[<sup>35</sup>S]-markierte CT441. Der Input der IVT betrug 10 µl je Ansatz. GST diente als Kontrolle.

Die Bindung des radioaktiv markierten SRAP1 wurde durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Abbildung 19B). SRAP1 bindet spezifisch sowohl an GST-CT441 als auch an GST-PDZ. Die Kontrolle mit der GST-Matrix weist keine Bindung auf. Auch hier wurde das Experiment unter den gleichen Bedingungen mit umgekehrten Interaktionspartnern durchgeführt. (Abbildung 19C und D). Es zeigt sich ebenfalls eine Bindung von [<sup>35</sup>S]-CT441 an GST-SRAP1, was darauf schließen lässt, dass es sich um eine direkte Interaktion zwischen der chlamydialen Protease CT441 und dem humanen SRAP1 handelt.

### **3.3.3 Die PDZ-Domäne von CT441 kann SRAP1 in zelluläre Kompartimente dirigieren**

Um nachzuweisen, dass eine *in vivo* Interaktion der Proteine möglich ist, wurden die Interaktionspartner in HEK293-Zellen überexprimiert. Dafür wurde einerseits SRAP1 C-terminal mit EGFP fusioniert und andererseits die PDZ-Domäne (AS 251-335) von CT441 C-terminal mit DsRED gekoppelt. Zusätzlich enthielt das PDZ-DsRED-Konstrukt ein N-terminales Kernlokalisierungssignal (NLS), sodass die exprimierte PDZ-Domäne in den Zellkern translokiert werden kann. Als Kontrolle diente ein HA-getaggttes PDZ-Konstrukt ohne NLS. HEK293-Zellen wurden transient mit dem SRAP1-EGFP- und dem NLS-PDZ-DsRED- bzw. dem HA-PDZ-Konstrukt ko-transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen fixiert, gegebenenfalls mit anti-HA- und sekundärem RRX-Antikörper inkubiert und die zelluläre Lokalisierung der Fusionsproteine mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abbildung 20).

Die Expression des NLS-PDZ-DsRED-Konstrukts im Zellkern (Abbildung 20C) hat eine Anreicherung des ko-exprimierten SRAP1-EGFP-Fusionsproteins ebenfalls im Bereich des Zellkerns zur Folge (Abbildung 20E). Dagegen zeigt sich in HEK293-Zellen, welche mit SRAP1-EGFP und der HA-fusionierten PDZ-Domäne ohne NLS ko-transfiziert wurden, eine gleichmäßige Verteilung des EGFP-Signals über das gesamte Zytoplasma und den Zellkern (Abbildung 20D und F). Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass die PDZ-Domäne von CT441 in humanen Zellen in der Lage ist SRAP1 in zelluläre Kompartimente zu dirigieren.

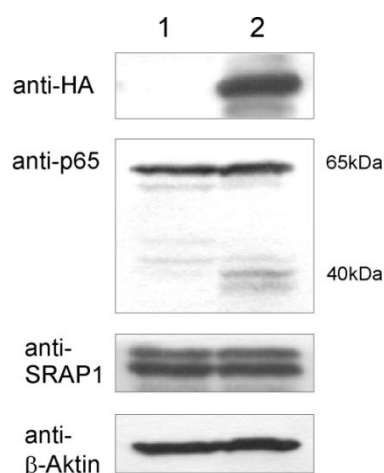


**Abbildung 20: Die Expression der NLS-fusionierten PDZ-Domäne von CT441 in HEK293-Zellen führt zu einer Anreicherung von SRAP1 im Zellkern.**

HEK293-Zellen wurden mit SRAP1-EGFP und dem PDZ(AS 251-335)-DsRED-Konstrukt mit N-terminalem NLS (A, C, E) oder dem HA-PDZ-Konstrukt ohne NLS (B, D, F) ko-transfiziert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (A und B). In Zellen, die mit dem NLS-PDZ-DsRED-Konstrukt (rot) ko-transfiziert wurden, zeigt sich eine Lokalisierung der PDZ-Domäne im Zellkern (C) und zusätzlich eine Anreicherung von SRAP1-EGFP ebenfalls in diesem Kompartiment (E). Dagegen sind in Zellen, welche mit dem HA-getaggten PDZ-Konstrukt ko-transfiziert wurden, beide Proteine, die PDZ-Domäne (D) und SRAP1 (F), gleichmäßig über das Zytoplasma und den Zellkern verteilt. Größenbalken = 20 µm.

### 3.3.4 SRAP1 wird nicht durch CT441 abgebaut

Im nächsten Schritt stellte sich die Frage, ob CT441 den Interaktionspartner SRAP1 nicht nur mithilfe der PDZ-Domäne binden kann, sondern ob die Protease auch in der Lage ist SRAP1 zu spalten, wie es für die p65-Untereinheit des NF-κB-Signalwegs beschrieben wurde (Lad *et al.*, 2007a; Lad *et al.*, 2007b).



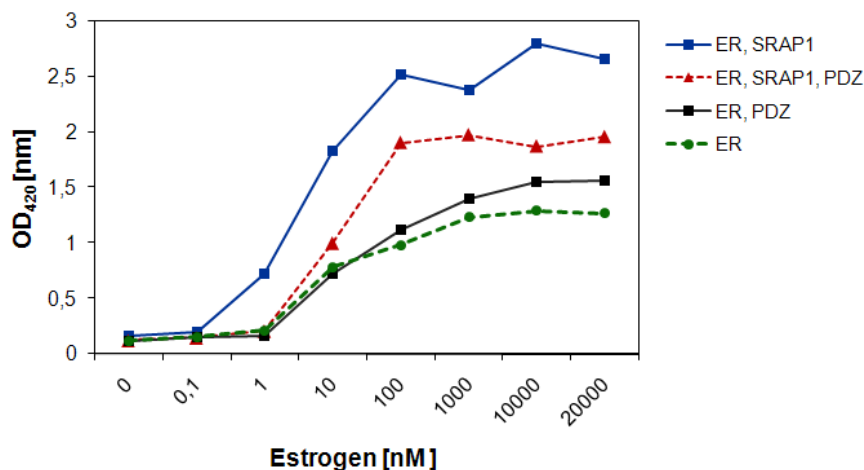
**Abbildung 21: SRAP1 wird nicht durch CT441 abgebaut.**

HEK293-Zellen wurden mit einem leeren Kontrollplasmid (Bahn 1) oder dem HA-CT441M-Konstrukt (Bahn 2) transfiziert. Die Spaltung der p65-Untereinheit von NF-κB ist im mittleren Blot gezeigt. SRAP1 und β-Aktin werden nicht abgebaut.

Dafür wurden HEK293-Zellen mit einem HA-CT441M-Konstrukt transfiziert und die Proteine im Western Blot analysiert. Als Kontrolle dienten Zellen, welche mit einem leeren Plasmid transfiziert wurden. In Abbildung 21 ist die Expression der HA-getaggten Protease CT441M dargestellt (Bahn 2). Im mittleren Blot wird die Detektion der p65-Untereinheit von NF- $\kappa$ B gezeigt. Im Zelllysats der mit dem CT441M-Konstrukt transfizierten Zellen ist, anders als beim Kontroll-Zelllysats, der Abbau des Proteins p65 zu einem 40 kDa großen Fragment erkennbar. Im Vergleich dazu ist in beiden Versuchsansätzen weder eine Spaltung von SRAP1 noch von  $\beta$ -Aktin durch CT441M detektierbar.

### **3.3.5 Die PDZ-Domäne von CT441 vermindert partiell die durch SRAP1 vermittelte Ko-Aktivierung des Estrogenrezeptors $\alpha$ in *S. cerevisiae***

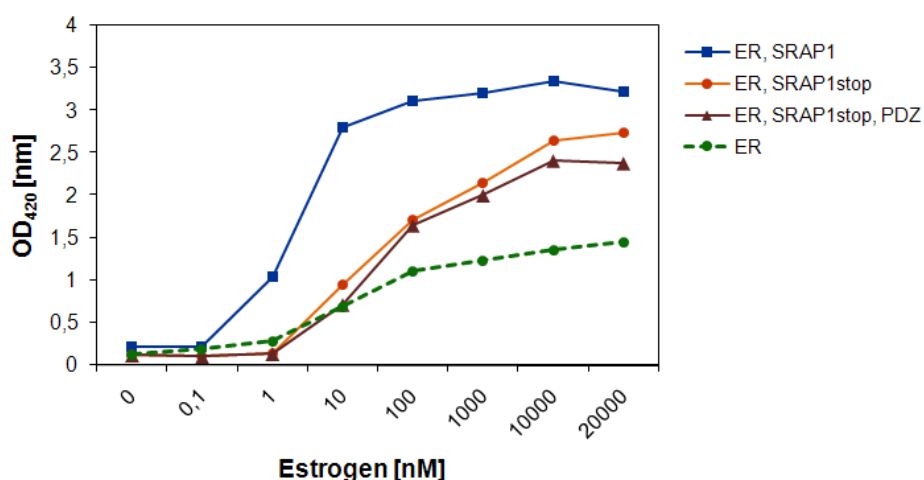
SRAP1 erhöht als Ko-Aktivator die Rezeptoraktivität des Estrogenrezeptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) und nimmt somit Einfluss auf die Transkriptionsrate von Zielgenen des ER $\alpha$  (siehe 1.10). Da CT441 SRAP1 zwar bindet, aber nicht spaltet, könnte SRAP1 über die Interaktion im Zytoplasma der Wirtszelle zurück gehalten werden und dadurch in seiner Ko-Aktivatorfunktion inhibiert werden. Um einen solchen Effekt zu zeigen, wurde ein Hefe-Estrogenrezeptor-Assay durchgeführt. Der Vorteil des Systems ist, dass *S. cerevisiae* selbst keine nukleären Rezeptoren besitzt, humane Estrogenrezeptoren aber in hormonabhängiger Weise funktionsfähig sind (Bitter 2007). Der *S. cerevisiae* Stamm YE1 besitzt sowohl einen ER $\alpha$ -Expressionsvektor (pG/ER(G)) als auch ein Plasmid, das ein *Hormone Responsive Element* (HRE) und einen  $\beta$ -Galaktosidasereporter enthält (pUC $\Delta$ SS-ERE). Zuerst wurde dieser Stamm mit Vektoren ko-transformiert, die das humane SRAP1 bzw. die PDZ-Domäne von CT441 aus *C. trachomatis* kodieren. Als Kontrolle wurde YE1 mit den entsprechenden leeren Vektoren transformiert. In Abbildung 22 ist gezeigt, dass beim Kontrollstamm der Estrogenrezeptor  $\alpha$  mit steigender Estrogenkonzentration stimuliert wird. Die zusätzliche Expression von SRAP1 führt zu einer Erhöhung der ER $\alpha$ -Stimulation. Dagegen hat die PDZ-Domäne von CT441 allein keinen Einfluss. Die Ko-Expression von SRAP1 und der PDZ-Domäne schwächt die Stimulation des ER $\alpha$  erheblich, jedoch nicht vollständig, ab.



**Abbildung 22:** Die PDZ-Domäne von CT441 vermindert partiell die durch SRAP1 vermittelte Ko-Aktivierung des Estrogenrezeptors  $\alpha$  in *S. cerevisiae*.

Im Stamm YE1, welcher nur den ER $\alpha$ -Expressionsvektor enthält, wird der ER $\alpha$  mit steigender Estrogenkonzentration stimuliert (ER). Durch die Expression von SRAP1 wird diese Stimulation erhöht (ER, SRAP1), während die PDZ-Domäne von CT441 keinen Einfluss hat (ER, PDZ). Die Ko-Expression von SRAP1 und PDZ führt zu einer abgeschwächten ER $\alpha$ -Stimulation (ER, SRAP1, PDZ), die jedoch stärker ist als im Kontrollstamm. Dargestellt sind die Daten eines repräsentativen Versuchs.

Wie in 1.10 bereits beschrieben ist das Protein SRAP1 genauso in der Lage humane Steroidrezeptoren zu stimulieren wie die funktionelle RNA SRA1. Somit wurde angenommen, dass die Stimulation von ER $\alpha$  durch das Protein SRAP1 selektiv durch die Bindung der PDZ-Domäne verhindert wird. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde ein mutiertes SRAP1-Konstrukt hergestellt, bei welchem direkt nach dem Translationsstart ein STOP-Codon eingebaut wurde. Dadurch ist die Synthese einer funktionellen RNA, aber nicht die des Proteins möglich.



**Abbildung 23:** Die Expression des mutierten SRAP1-STOP-Konstrukts führt zu einer mittelstarken Stimulation von ER $\alpha$ .

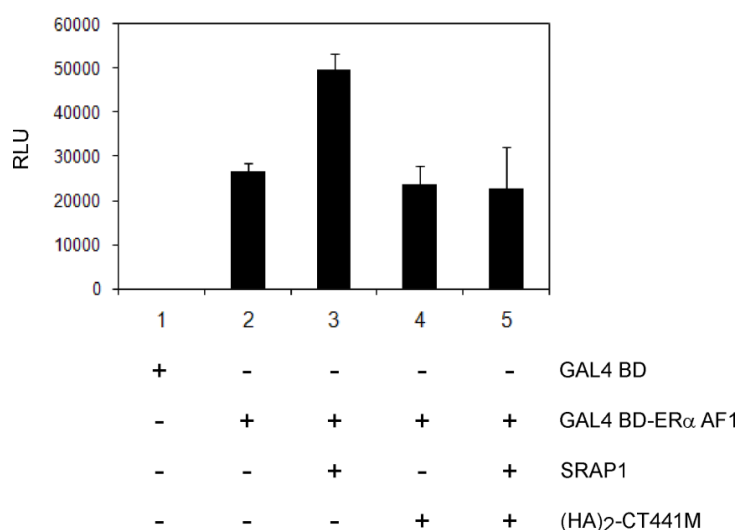
Der YE1-Stamm, der das mutierte SRAP1-Konstrukt mit einem STOP-Codon nach dem Translationsstart exprimiert, zeigt eine mittlere Stimulation von ER $\alpha$  (ER, SRAP1<sub>stop</sub>). Die zusätzliche Expression der PDZ-Domäne von CT441 hat keinen Effekt (ER, SRAP1<sub>stop</sub>, PDZ). Dargestellt sind die Daten eines repräsentativen Versuchs.

Die Expression dieses Konstrukts führt zu einer mittelstarken Stimulation des ER $\alpha$  und die Ko-Expression der PDZ-Domäne von CT441 hat keinen Einfluss (Abbildung 23).

Es konnte somit gezeigt werden, dass sowohl die funktionelle RNA als auch das Protein von SRAP1 den Estrogenrezeptor  $\alpha$  in *S. cerevisiae* stimulieren können. Dabei kann die durch das Protein SRAP1 vermittelte Stimulation von ER $\alpha$  selektiv durch die Bindung der PDZ-Domäne von CT441 inhibiert werden.

### 3.3.6 CT441 vermindert die Ligand-unabhängige Ko-Aktivierung der ER $\alpha$ AF1-Domäne durch SRAP1 in humanen Zellen

Um zu ermitteln, ob die komplette Protease CT441M SRAP1 in humanen Zellen in seiner Ko-Aktivatorfunktion beeinflussen kann, wurde ein Versuch mit der Ligand-unabhängigen AF1-Domäne des ER $\alpha$  durchgeführt (Coleman *et al.*, 2004). HEK293-Zellen wurden mit pFR-*Luc* und pCMV-*GAL4*-BD-ER $\alpha$ -AF1-Domäne ko-transfiziert (Abbildung 24). Als Kontrolle diente das Reporterkonstrukt ohne ER $\alpha$ -AF1-Domäne (Säule 1).



**Abbildung 24: Die Ligand-unabhängige Ko-Aktivierung der ER $\alpha$ -AF1-Domäne durch SRAP1 in HEK293-Zellen wird durch CT441 unterdrückt.**

HEK293-Zellen wurden ko-transfiziert mit pFR-*Luc* und pCMV-*GAL4*-BD (1) oder pCMV-*GAL4*-BD-ER $\alpha$ -AF1-Domäne (2). Zusätzlich wurden SRAP1 (3), CT441M (4) oder beide (5) überexprimiert. Im Vergleich zur Kontrolle erfolgt durch die ER $\alpha$ -AF1-Domäne eine deutliche Erhöhung der Transkriptionsaktivität (2). Durch die Überexpression von SRAP1 wird diese Aktivität weiter verstärkt (3), während die Expression von CT441M keinen Einfluss hat (4). Werden beide Proteine, SRAP1 und CT441M, ko-exprimiert kommt es zu keiner weiteren Erhöhung der durch die ER $\alpha$ -AF1-Domäne ausgelösten Transkriptionsaktivierung. Die Werte wurden in drei unabhängigen Experimenten ermittelt. RLU = relative luciferase units.

Im Vergleich zur Kontrolle zeigt sich eine deutliche Transkriptionsaktivierung durch die ER $\alpha$ -AF1-Domäne auch ohne exogenen Ko-Aktivator (Säule 2). Die Überexpression von

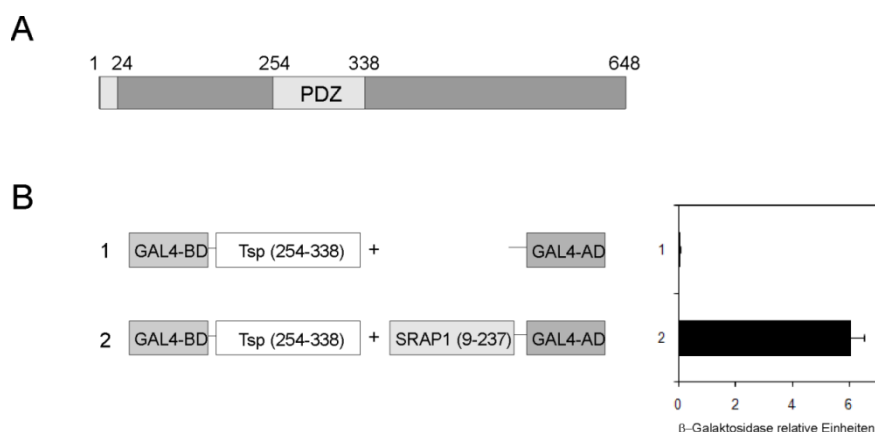
SRAP1 erhöht diese Stimulation um das Zweifache (Säule 3). Die Protease CT441M allein hat keinen Einfluss auf die Aktivität der ER $\alpha$ -AF1-Domäne (Säule 4). Allerdings zeigt sich bei einer Ko-Expression von SRAP1 und CT441M keine weitere Stimulation über die basale Aktivität der ER $\alpha$ -AF1-Domäne hinaus (Säule 5). Es konnte somit gezeigt werden, dass CT441M die Erhöhung der Aktivität der ER $\alpha$ -AF1-Domäne durch SRAP1 unterdrücken kann.

### 3.4 Die PDZ-Protease Cpn0555 aus *Cp. pneumoniae* interagiert mit SRAP1

Auch in der zweiten humanpathogenen Art *Chlamydophila (Cp.) pneumoniae* existiert eine endenspezifische Protease (Tsp), die eine PDZ-Domäne enthält (Abbildung 25A). Es sollte überprüft werden, ob die Interaktion mit dem humanen SRAP1 spezifisch für *C. trachomatis* ist oder ob sie auch in *Cp. pneumoniae* eine Rolle spielt.

#### 3.4.1 Interaktion der Protease Cpn0555 mit SRAP1 im Hefe-Zweihybrid-System

Die PDZ-Domäne (AS 254-338) aus Cpn0555 wurde in pGBKT7 kloniert und mit dem Zweihybrid-Klon pGADT7-SRAP1 (AS 9-237) in *S. cerevisiae* ko-transformiert. Im  $\beta$ -Galaktosidase Flüssig-Assay ist eine deutliche Aktivierung des *lacZ*-Reportergens erkennbar (Abbildung 25B, Balken 2). Bei der Kontrolle mit GAL4-BD-PDZ (AS 254-338) und pGADT7 ist keine Aktivierung nachweisbar (Abbildung 25B, Balken 1).



**Abbildung 25: Die Protease Cpn0555 interagiert mit SRAP1 im Hefe-Zweihybrid-System.**

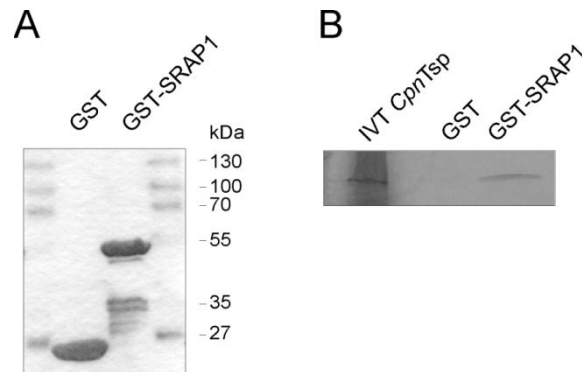
(A) Schematische Struktur der Tsp aus *Cp. pneumoniae* mit Lokalisierungssequenz (AS 1-24) und PDZ-Domäne (AS 254-338). (B)  $\beta$ -Galaktosidase Flüssig-Assay in *S. cerevisiae* ko-transformiert mit GAL4-BD-PDZ (AS 254-338) und pGADT7 (1) oder pGADT7-SRAP1 (AS 9-237) (2). Die Werte wurden in drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

#### 3.4.2 Cpn0555 interagiert *in vitro* direkt mit SRAP1

Im nächsten Schritt sollte nun die direkte Interaktion der kompletten Protease Cpn0555 aus *Cp. pneumoniae* mit SRAP1 nachgewiesen werden. Dafür wurde SRAP1 mit GST fusioniert und an eine Glutathion Sepharose-Matrix gekoppelt (Abbildung 26A). Die komplette Protease wurde mit dem Konstrukt pET-CpnTsp und L-[ $^{35}$ S]-Methionin *in vitro* transkribiert und translatiert und anschließend mit GST-SRAP1 inkubiert. Mittels



Autoradiografie konnte die Bindung der Protease analysiert werden (Abbildung 26B). Während bei der GST-Kontrolle die Protease nicht bindet, ist ein deutliches Signal bei GST-SRAP1 erkennbar.

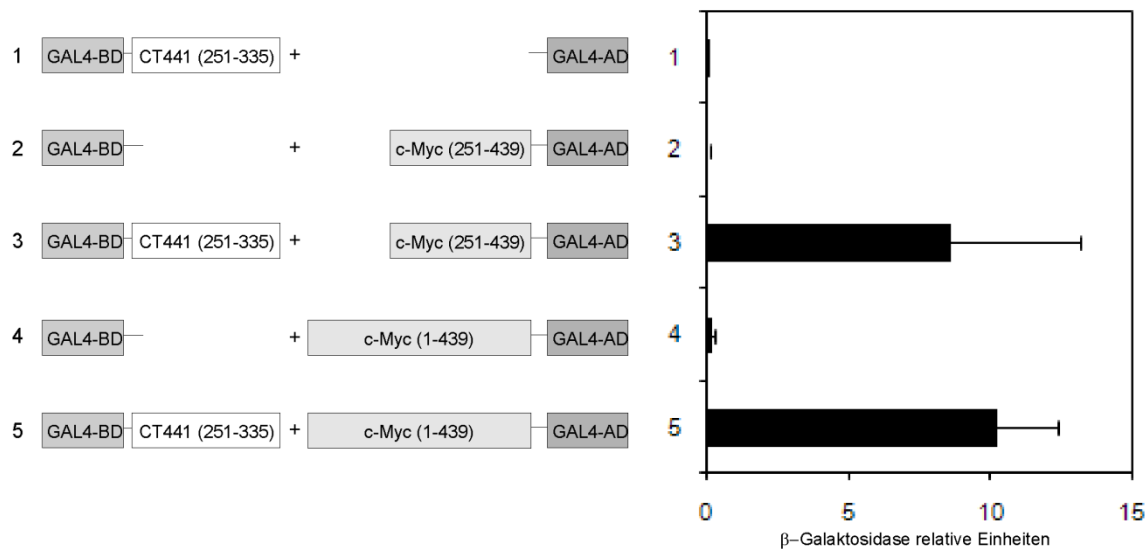


**Abbildung 26: Die Protease Cpn0555 aus *Cp. pneumoniae* interagiert *in vitro* direkt mit SRAP1.**

(A) Coomassie-Färbung der Aufreinigungen von GST und GST-SRAP1. (B) Ergebnis des GST-Pulldown-Experiments, bei welchem die L-[35S]-markierte Protease Cpn0555 (CpnTsp) eingesetzt wurde. Input: 10  $\mu$ l der IVT.

### 3.5 Die PDZ-Domäne von CT441 interagiert mit c-Myc in Hefe-Zweihybrid-System

Bei dem Hefe-Zweihybrid-Screening mit der PDZ-Domäne (AS 251-335) von CT441 aus *C. trachomatis* wurde ein weiterer interagierender Klon identifiziert. Es handelt sich um den C-terminalen Teil (AS 251-439) des Protoonkogens c-Myc (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Die PDZ-Domäne von CT441 interagiert mit c-Myc in Hefe-Zweihybrid-System.**

Die Ko-Expression von GAL4-BD-PDZ und GAL4-AD-c-Myc (AS 251-439) (3) oder GAL4-AD-c-Myc (AS 1-439) (5) führt zu einer Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Kontrollen: GAL4-BD-PDZ mit pGADT7 (1) und pGBKT7 mit GAL4-AD-c-Myc (AS 251-439) (2) oder GAL4-AD-c-Myc (AS 1-439) (4). Die Werte wurden in drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Wie in 3.1.1 beschrieben wird durch die Expression des GAL4-BD-PDZ-Konstruktes in *S. cerevisiae* Y190 keines der Reportergene *HIS3* und *lacZ* aktiviert (Abbildung 27, 1). Auch der Zweihybrid-Klon GAL4-AD-c-Myc (AS 251-439), ko-transformiert mit pGBKT7, induziert keine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität (Abbildung 27, 2). Die Ko-Expression von GAL4-BD-PDZ (AS 251-335) und GAL4-AD-c-Myc (AS 251-439) führt zu einer signifikanten Erhöhung der Aktivität im  $\beta$ -Galaktosidase Flüssig-Assay (Abbildung 27, 3). Im nächsten Schritt sollte die Interaktion der PDZ-Domäne von CT441 mit dem kompletten c-Myc-Protein gezeigt werden. Das Konstrukt GAL4-AD-c-Myc (1-439), ko-transformiert mit pGBKT7, führt zu keiner Aktivierung (Abbildung 27, 4). Es ist also ebenfalls nicht selbstaktivierend, während die Expression zusammen mit dem PDZ-Domäne-Konstrukt eine deutliche Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität zur Folge hat (Abbildung 27, 5). Es wurde somit gezeigt, dass die PDZ-Domäne von CT441 im Hefe-Zweihybrid-System mit dem C-terminalen Teil (AS 251-439) und dem kompletten Protein (AS 1-439) von c-Myc interagiert.

## 4. Diskussion

Als intrazelluläre Parasiten haben Chlamydien effektive Strategien entwickelt um in die Wirtszelle zu gelangen und dort überleben zu können. Einerseits werden zelluläre Prozesse umgeleitet und genutzt, zum Beispiel beim Zelleintritt und zur Nährstoffbeschaffung, andererseits müssen Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus, wie die Immunantwort oder die Einleitung der Apoptose, verhindert werden. Chlamydien besitzen die Fähigkeit Effektorproteine zu exprimieren und diese über das Typ-II- oder das Typ-III-Sekretionssystem in die Wirtszelle zu transportieren. Bisher wurden einige dieser Wirts-interagierenden Proteine identifiziert. Dazu gehören beispielsweise TARP und CT694, welche bei der Invasion und der Umverteilung von Aktinfilamenten beteiligt sind (Jewett *et al.*, 2006; Hower *et al.*, 2009). Inc-Proteine können über direkte Interaktionen in vesikuläre Abläufe eingreifen (Rzomp *et al.*, 2006; Cortes *et al.*, 2007; Delevoye *et al.*, 2008). Des Weiteren werden Effektoren sekretiert, die in die NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion eingreifen, den Zellzyklus verändern oder den apoptotischen Zelltod verhindern (Valdivia 2008; Betts *et al.*, 2008). Die meisten dieser Effektoren interagieren direkt mit Wirtszellproteinen und machen sie zellulären Prozessen unzugänglich oder fördern ihre Degradation (Scidmore und Hackstadt, 2001; Le Negrate *et al.*, 2008; Wolf *et al.*, 2009; Chellas-Géry *et al.*, 2007). Es wurden aber auch zwei Proteasen identifiziert, CT441 und CPAF, welche über den Abbau ihrer Zielproteine in die Zellfunktion eingreifen (Lad *et al.*, 2007a; Pirbhai *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2001).

### 4.1 IncA interagiert mit G3BP1

Eines der ersten identifizierten Effektorproteine, welches über das Typ-III-Sekretionssystem in die Einschlusskörpermembran transportiert wird, ist das Inklusionsmembranprotein IncA (Beeckman *et al.*, 2008). Obwohl die Sequenzähnlichkeit der IncA-Proteine bei den verschiedenen Arten der *Chlamydiaceae* sehr gering ist, sind die biochemischen Eigenschaften der Proteine konserviert. Del 2004. IncA ist über eine große, N-terminale Domäne in der Inklusionsmembran verankert und besitzt eine zytoplasmatische Domäne, die in das Wirtszellzytosol ragt. Es wurde gezeigt, dass die IncA-Proteine der beiden Gattungen *C. trachomatis* und *Cp. psittaci* Multimere bilden können. Für *C. trachomatis* wurde beschrieben, dass IncA bei der Membranfusion eine

wichtige Rolle spielt, denn IncA<sup>-</sup>-Stämme zeigen deutliche Störungen bei der Entwicklung der Inklusion (Suchland *et al.*, 2000). An diesem Prozess könnte das SNARE-ähnliche Motiv in der zytoplasmatischen Domäne beteiligt sein, über welches IncA zusätzlich mit Wirtszell-SNAREs interagieren und die Membranfusion der Wirtszelle beeinflussen kann (Delevoye *et al.*, 2008). Wird IncA ektopisch in humanen Zellen überexprimiert, lokalisiert es im Endoplasmatischen Retikulum und verhindert bei gleichzeitiger Infektion, sowohl bei *C. trachomatis* als auch bei *Cp. psittaci*, die normale Entwicklung des Einschlusskörpers. Da die bisherigen Erkenntnisse über IncA fast ausschließlich von den humanpathogenen Arten *C. trachomatis* und *Cp. pneumoniae* stammen, wurde für diese Arbeit der Fokus auf IncA aus dem zoonotischen Erreger *Cp. psittaci* gelegt.

In einem Hefe-Zweihybrid-Screening wurde die zytoplasmatische Domäne verwendet um interagierende Wirtszellproteine zu finden und dadurch weitere Funktionen von IncA zu charakterisieren. Als Interaktionspartner von IncA aus *Cp. psittaci* wurde das humane Protein G3BP1 identifiziert (3.1.1). In GST-Pulldown-Experimenten konnte die Interaktion *in vitro* sowohl zwischen der zytoplasmatischen Domäne von IncA als auch dem kompletten IncA-Protein und G3BP1 bestätigt werden (3.1.2). Die Interaktion wurde auch *in vivo* in HEK293-Zellen, die mit einem IncA-Expressionskonstrukt transfiziert wurden, gezeigt, da G3BP1 durch IncA ko-immunopräzipitiert werden konnte (3.1.3). Zusätzlich konnte mithilfe von Immunfluoreszenz eine Akkumulation von G3BP1 in mit *Cp. psittaci*-infizierten HEp-2-Zellen um den Einschlusskörper gezeigt werden (3.1.4). Dabei wurde einerseits das endogene Protein detektiert, andererseits ein DsRED-G3BP1-Konstrukt verwendet. Letzteres assembliert in Stressgranula, welche sich in uninfizierten Zellen zytoplasmatisch um den Kern verteilen (Tourriere *et al.*, 2003). Bei *Cp. psittaci*-infizierten HEp-2-Zellen war das Signal um die Einschlusskörper detektierbar. Obwohl die IncA-Proteine der verschiedenen Arten nur eine sehr geringe Sequenzhomologie aufweisen, interagiert auch IncA aus *C. trachomatis* mit G3BP1 sowohl in *S. cerevisiae* als auch *in vitro* im GST-Pulldown (3.2).

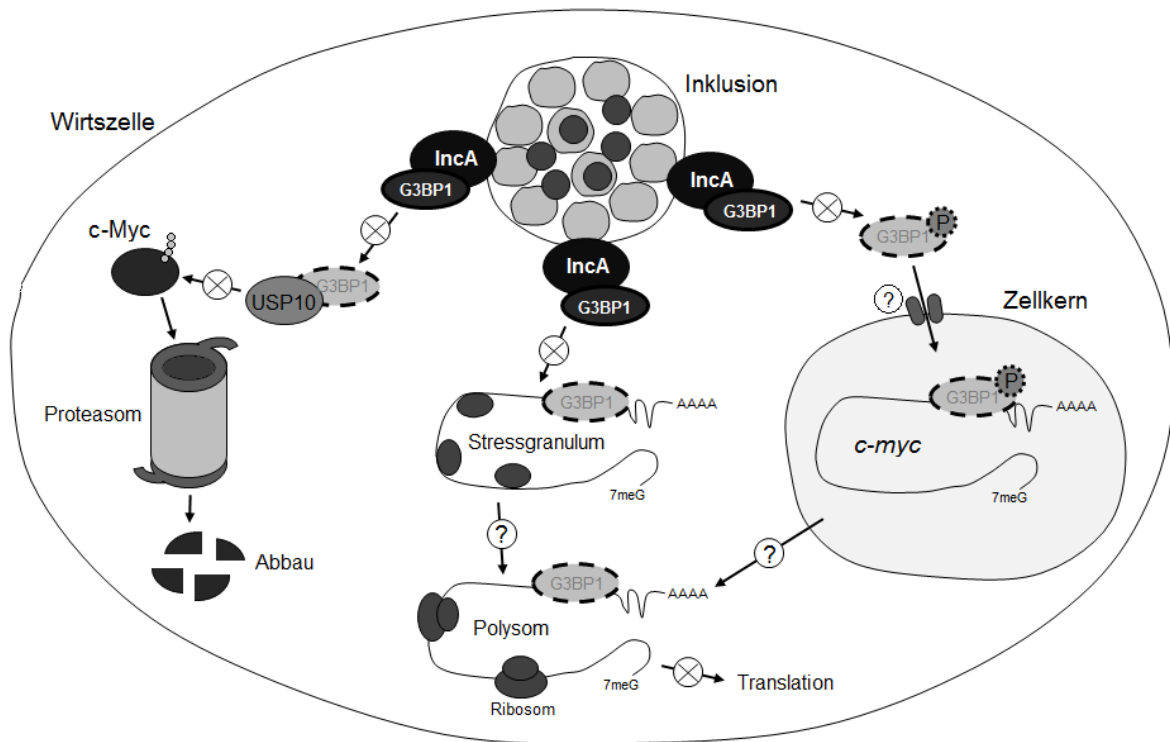
Im nächsten Schritt stellte sich natürlich die Frage nach der funktionellen Relevanz der Interaktion zwischen IncA und G3BP1. Wie bereits erwähnt besitzt G3BP1 eine phosphorylierungsabhängige RNase-Aktivität und spaltet spezifisch in der 3'-untranslatierten Region der humanen *c-myc* mRNA (Gallouzi *et al.*, 1998). Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob es bei der *c-myc* mRNA und/ oder bei dem c-Myc-Protein Konzentrationsänderungen in infizierten Zellen gibt. Dabei blieb die Konzentration

der *c-myc* mRNA jedoch während der Infektion von HEp-2-Zellen mit *Cp. psittaci* unverändert (3.1.5). Im Gegensatz dazu war aber eine signifikante Abnahme von c-Myc-Protein mit zunehmender Dauer der Infektion detektierbar (3.1.6). Die Überexpression der zytoplasmatischen Domäne von IncA aus *Cp. psittaci* in HEK293-Zellen führte zu dem gleichen Effekt. Dagegen hatte die Expression eines mutierten IncA-Konstrukts, welches nicht mehr mit G3BP1 interagieren kann, keinen Einfluss auf die c-Myc-Proteinkonzentration (3.1.7.1). Darüber hinaus wurde mittels siRNA-*Knockdown* die G3BP1-Konzentration in HEK293-Zellen herunter reguliert, was im gleichen Zug zu einer Abnahme von c-Myc-Protein führte (3.1.7.2). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Effekt der Abnahme von c-Myc-Protein auch in der infizierten Zelle der Interaktion zwischen IncA und G3BP1 zugeschrieben werden kann.

Wie die Interaktion von IncA und G3BP1 mit der c-Myc-Proteinkonzentration in Zusammenhang steht, ist allerdings noch unklar. Ein Ansatz wäre, dass die Interaktion einen zellulären Proteinstabilisierungsmechanismus von c-Myc zerstört, an dem G3BP1 normalerweise über die Interaktion mit anderen Wirtszellproteinen beteiligt ist. Ein Beispiel für eine solche Protein-stabilisierende Interaktion ist der Komplex von G3BP1 mit der Ubiquitin spezifischen Protease USP10, welcher sowohl in menschlichen Zellen als auch in *S. cerevisiae* beschrieben wurde (Soncini *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2003). UPS10 entfernt Ubiquitin von Proteinen, wodurch sie vom proteasomalen Abbau ausgenommen und stabilisiert werden. Für *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass das G3BP1-Homolog Bre5 ein Ko-Faktor von Ubp3, dem USP10-Homolog in Hefe, ist und für die Bildung eines aktiven De-Ubiquitinylierungskomplexes benötigt wird (Cohen *et al.*, 2003). Allerdings bleibt zu klären, ob durch diesen Mechanismus der Proteinstabilisierung auch die c-Myc-Konzentration beeinflusst wird. Zumindest wurde beschrieben, dass c-Myc in humanen Tumorzellen durch eine andere Ubiquitin spezifische Protease, USP28, stabilisiert wird (Popov *et al.*, 2007). Ob die gleiche Aufgabe USP10 im Komplex mit G3BP1 zugeschrieben werden kann, ist nicht klar. Es ist aber durchaus vorstellbar, dass G3BP1 auch mit anderen de-ubiquitinylierenden Enzymen interagiert, welche c-Myc als Substrat haben könnten. Wäre dies jedoch der Fall, könnte die Bildung des G3BP1-USP10-Komplexes durch die Interaktion des chlamydialen IncA mit G3BP1 beeinträchtigt werden, wodurch die Stabilisierung von c-Myc gehemmt wird.

Ein anderer Aspekt, der einen Einfluss auf die Proteinkonzentration von c-Myc haben kann, ist die Eigenschaft von G3BP1 sowohl RNA binden zu können als auch eine NTF2-

ähnliche Domäne (*Nuclear transport factor 2*) zu besitzen (Tourriere *et al.*, 2003). G3BP1 weist eine phosphorylierungsabhängige RNase-Aktivität auf, jedoch könnte es mit seiner Ziel-mRNA auch nur in einem hnRNP-Komplex (*Heterogeneous ribonucleoprotein*) vorliegen. Zwar wurde gezeigt, dass G3BP1 und *c-myc*-mRNA assoziieren und auch, dass G3BP1 die *c-myc*-mRNA *in vitro* spaltet, jedoch steht der Beweis für die tatsächliche RNase-Aktivität für *c-myc*-mRNA *in vivo* noch aus (Tourriere *et al.*, 2001). Interessanterweise assembliert G3BP1, wie bereits erwähnt, in der Zelle in Stressgranula, welche aus untranslatierter mRNA und Proteinen bestehen (Tourriere *et al.*, 2003). Aus diesen Zwischenlagern für ungenutzte Translations-Initiations-Komplexe werden mRNAs entweder wieder für die Translation bereitgestellt oder Abbauprozessen übergeben (Kedersha und Anderson, 2002). Es wurde auch gezeigt, dass G3BP1 als Polysom-assoziiertes Protein im Zytoplasma neuronaler Zellen zusammen mit *tau*-mRNA (Tau ist ein Regulator bei der Zytoskelettmodellierung) in einem mRNP-Komplex (*messenger Ribonucleoprotein*) vorliegt (Atlas *et al.*, 2004). G3BP1 könnte also an der Sortierung und der Stabilisierung von spezifischen mRNAs, darunter eventuell auch der *c-myc* mRNA, beteiligt sein. Es wurde sogar vermutet, dass G3BP1 im Kern an die mRNA bindet und den Transport aus dem Kern in das Zytoplasma erleichtert. Dies ist jedoch sehr spekulativ und bedarf weiterer Analysen. Ausgehend von dem in dieser Arbeit gezeigten Ergebnis, dass G3BP1 um den Einschlusskörper akkumuliert, könnte IncA über die Interaktion mit G3BP1 Einfluss auf die Bereitstellung der *c-myc* mRNA für die Translation nehmen. Cristea *et al.* zeigten, dass in mit Alphaviren infizierte Ratten-Fibroblasten G3BP1 mit den Erregern ko-lokalisiert und aus dem Zellsystem genommen wird. Sie vermuten, dass so der G3BP1-abhängige Export von Wirtszell-mRNA blockiert wird. Dadurch kommt es nicht zur Translation (Cristea *et al.*, 2006). Es wäre also möglich, dass Chlamydien über eine Zurückhaltung von G3BP1 an der Einschlusskörpermembran die Bereitstellung von *c-myc*-mRNA für die Translation einschränken. Dies wäre auch eine weitere Erklärung dafür, dass die c-Myc-Proteinkonzentration im Verlauf der Infektion abnimmt, die *c-myc* mRNA aber unverändert bleibt. Vielleicht resultiert der Einfluss von G3BP1 auf die c-Myc-Konzentration aber auch aus einer Kombination von Proteinstabilisierung und seiner Rolle im RNA-Metabolismus. In Folge dessen wäre die Interaktion von IncA und G3BP1 während der chlamydialen Infektion umso bedeutender, denn damit würde ein multifunktionaler Akteur der Wirtszelle beschlagnahmt und den zellulären Prozessen, welche die benötigten c-Myc-Proteinkonzentrationen gewährleisten, entzogen werden.



**Abbildung 28: Möglicher Einfluss der Interaktion von IncA und G3BP1 auf die c-Myc-Proteinkonzentration.**

Links: Durch die Verhinderung der Bindung an die Ubiquitin-spezifische Protease USP10 (oder einer anderen USP) kann der De-Ubiquitylierungskomplex nicht gebildet werden und das Protein wird proteasomal abgebaut. Mitte: G3BP1 liegt in Stressgranula in der Zelle vor. In diesen könnte die *c-myc*-mRNA von G3BP1 stabilisiert, zurückgehalten und für die Translation zur Verfügung gestellt werden. Die Beschlagnahme von G3BP1 an der Inklusionsmembran könnte die Sortierung und Bereitstellung von *c-myc*-mRNA stören. Eine mögliche Funktion von G3BP1 im Polysom könnte verhindert werden. Rechts: Im phosphorylierten Zustand kann G3BP1 in den Zellkern gelangen und dort möglicherweise an *c-myc*-mRNA binden. Eine Erleichterung des Transports aus dem Zellkern durch die Bindung wird diskutiert.

Der Transkriptionsfaktor c-Myc ist ein weitreichender Regulator von Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Eilers und Eisenman, 2008). Aufgrund seiner Vielfältigkeit bei der Einflussnahme auf das Zellschicksal ist es nicht verwunderlich, dass Wirtszellen komplexe Wege entwickelt haben um adäquate c-Myc-Konzentrationen zu gewährleisten. Die Expression von c-Myc ist auf jeder möglichen Ebene reguliert: transkriptional (Initiation und Elongation), post-transkriptional (mRNA-Stabilität und Translationinitiation) und post-translational (Proteinstabilität) (Meyer und Penn, 2008). Eine De-Regulation von c-Myc führt zu einer Aktivierung von Arf, das wiederum den Tumorsuppressor p53 aktiviert (Zindy *et al.*, 1998). p53 reguliert eine Vielzahl von Zielgenen, die bei der Einleitung der Apoptose eine Rolle spielen (Hermeking und Eick, 1994). Daneben gibt es noch einige weitere c-Myc-induzierte Signalwege, an deren Ende der programmierte Zelltod steht (Nilsson und Cleveland, 2003). Als obligat intrazelluläre Organismen sind die *Chlamydiaceae* auf eine intakte Wirtszelle angewiesen um replizieren und sich effektiv vermehren zu können. Dafür haben sie verschiedene Strategien

entwickelt um den apoptotischen Zelltod im Wirt zu verhindern (Böhme und Rudel, 2009). Eine dieser Strategien ist der Abbau von pro-apoptotischen BH3-*only*-Proteinen durch die chlamydiale Protease CPAF (Pirbhai *et al.*, 2006). Über die Interaktion von IncG mit dem humanen Protein 14-3-3 $\beta$  wird das pro-apoptotische BAD an der Einschlusskörpermembran zurückgehalten (Scidmore und Hackstadt, 2001). Ein zusätzlicher Mechanismus ist die Erhöhung der Expression von anti-apoptotischen Bcl-2-*like*-Proteinen wie zum Beispiel Mcl-1 (Rajalingam *et al.*, 2008). Es ist also vorstellbar, dass es sich bei den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen um eine weitere Strategie handelt, welche von *Cp. psittaci* genutzt wird, um die durch c-Myc vermittelte Wirtszellapoptose zu verhindern.

Neben der Apoptose ist die Regulation des Zellzyklus und folglich auch der Proliferation von tragender Wichtigkeit für die chlamydiale Entwicklung. c-Myc ermöglicht das Wachstum der Wirtszelle, indem es für einen ausreichenden Vorrat an Grundbausteinen sorgt. Viele Zielgenprodukte von c-Myc spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des zellulären Metabolismus, bei der ribosomalen und mitochondrialen Biogenese sowie bei der Synthese von Proteinen und Nukleinsäuren (Meyer und Penn, 2008). Des Weiteren kann c-Myc nicht nur das Zellwachstum stimulieren, sondern auch Zellzyklus-Inhibitoren außer Kraft setzen. Diese Kombination von Funktionen liefert, wenn c-Myc de-reguliert ist, das unbegrenzte replikative Potenzial, das für beinahe alle Tumore charakteristisch ist (Eilers und Eisenmann, 2008).

Es ist weitestgehend akzeptiert, dass sich *Chlamydiaceae* vorwiegend in ausdifferenzierten Epithelzellen der Schleimhäute und nicht in sich teilenden Zellen entwickeln (Moulder, 1991). Für *C. trachomatis*-infizierte Zellen wurde gezeigt, dass sie sich mit einer geringeren Rate teilen als die nicht infizierten Kontrollzellen (Horoschak und Moulder, 1978). Darüber hinaus inhibiert *C. trachomatis* die Wirtszellzytogenese und induziert den Abbau des mitotischen Cyclin B1 (Greene und Zhong, 2003; Balsara *et al.*, 2006). Die Absenkung der c-Myc-Proteinkonzentration könnte also weiterhin ein alternativer Weg von *Cp. psittaci* und *C. trachomatis* sein, die Wirtszellproliferation zu reduzieren und somit optimale Bedingungen für die Entwicklung der obligat intrazellulären Parasiten in der Wirtszelle zu schaffen. Allerdings müssen für *C. trachomatis*, um eine Aussage über die funktionelle Relevanz der Interaktion zwischen IncA und G3BP1 treffen zu können, weitere Versuche angestellt werden.



## 4.2 Die Protease CT441 interagiert mit SRAP1

Neben der Interaktion zwischen dem chlamydialen Typ-III-sekretierten Protein IncA und dem humanen G3BP1 wurde im Rahmen dieser Arbeit eine weitere Interaktion im Hefe-Zweihybrid-Screening identifiziert. Dafür wurde die PDZ-Domäne der Typ-II-sekretierten Tsp CT441 aus *C. trachomatis* verwendet. Die bisher bekannte Funktion von CT441 ist die Spaltung des Proteins p65 von NF- $\kappa$ B. Sie ist somit an der Dysregulation der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion und der Wirtszellimmunantwort beteiligt (Lad *et al.*, 2007b). Als spezifischer Interaktionspartner der PDZ-Domäne von CT441 wurde das Estrogenrezeptor  $\alpha$ -Ko-Aktivator Protein 1 (SRAP1) gefunden (3.3). Die Interaktion konnte sowohl in *S. cerevisiae* und als auch im *in vitro*-System nachgewiesen werden (3.3.1, 3.3.2). *In vivo* war die PDZ-Domäne in der Lage SRAP1 in subzelluläre Kompartimente zu dirigieren (3.3.3). Ein Abbau von SRAP1 durch CT441 konnte nicht gezeigt werden (3.3.4).

Wie bereits erwähnt (1.10) wurde für den Steroidrezeptor-RNA-Aktivator 1 (SRA1) ursprünglich angenommen, dass es sich um eine funktionelle, nicht-kodierende RNA handelt (Lanz *et al.*, 1999). Als Ko-Aktivator erhöht SRA1 die Rezeptoraktivität von ER $\alpha$  und nimmt dadurch Einfluss auf die Transkriptionsrate der Zielgene. In Brustkrebszellen wurde jedoch mittlerweile das Protein SRAP1 identifiziert, welches sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorkommt (Chooniedass-Kothari *et al.*, 2004). Während die Rolle der nicht-kodierenden RNA bei der ER $\alpha$ -spezifischen Aktivierung bereits bekannt ist (Coleman *et al.*, 2004), wurde durch den Estrogenrezeptor-Assay in *S. cerevisiae* gezeigt, dass auch das Protein SRAP1 als Ko-Aktivator von ER $\alpha$  fungiert. Dabei kann die PDZ-Domäne von CT441 die ER $\alpha$ -Aktivierung teilweise vermindern (3.3.5). Im humanen Zellsystem, bei welchem die Estrogen-unabhängige Aktivierungsdomäne (AF-1) des ER $\alpha$  verwendet wurde, zeigte sich ebenfalls eine Aktivierung durch die zusätzliche Überexpression von SRAP1 (3.3.6). Dabei konnte auch hier die Inhibierung der Ko-Aktivierungsfunktion von SRAP1 durch das zusätzliche Einbringen der Protease CT441 gezeigt werden. Es könnte sich somit um eine neue Möglichkeit der Wirtszellkontrolle durch Chlamydien handeln.

Estrogen und die Stimulierung der Transkription von ER $\alpha$ -Zielgenen spielen bei verschiedenen Punkten der chlamydialen Infektion eine wichtige Rolle. Sowohl die Zellanlagerung und die Infektiosität von Chlamydien *in vitro*, als auch der

Krankheitsverlauf und das Auftreten von Folgeerkrankungen *in vivo* können durch Estrogen beeinflusst werden (Guseva *et al.*, 2005). Die ER $\alpha$ -gesteuerte Expression von Zielproteinen kann die Regulation vieler zellulärer Prozesse wie Signaltransduktion, Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und somit die spezifischen Organfunktionen verändern. Sie ist daher ein entscheidender Faktor beim Wachstum von Brustkrebsgewebe und ein wichtiger Ansatzpunkt für Therapeutika. Eine große Anzahl von Zielgenen des ER $\alpha$  wurde bereits identifiziert (Lin *et al.*, 2007; O'Lone *et al.*, 2004). Das Produkt von *WNT11* (*wingless-type MMTV integration site family member 11*) vermittelt die Migration von Tumorzellen und erhöht das Überleben der Zelle durch die signifikante Verminderung von Apoptose (Dwyer *et al.*, 2010; Uysal-Onganer *et al.*, 2010). Wie bereits erwähnt, ist letzteres ein Prozess, der während der chlamydialen Infektion über mehrere Wege streng kontrolliert wird (siehe Abschnitt 1.4). Ein anderes ER $\alpha$ -Zielgen kodiert für das anti-apoptotische Protein Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) (O'Lone *et al.*, 2004). In ER-positiven, Hormon-abhängigen Brustkrebszellen wird auch die Expression des Proto-Onkogens c-Myc und des Zellzyklusregulators Cyclin D1 durch Estrogen und ER $\alpha$  beeinflusst (Butt *et al.*, 2005). Als Ko-Aktivator von ER $\alpha$  nehmen sowohl die RNA SRA1 als auch das Protein SRAP1 eine entscheidende Rolle bei der Steuerung der Transkriptionsaktivierung dieser Zielgene ein. Der Protein-Anteil der Ko-Aktivierung könnte während der chlamydialen Infektion über die Interaktion mit CT441 beeinflusst werden. Wie in (3.3.3) gezeigt, kann die PDZ-Domäne der Protease CT441 SRAP1 in zelluläre Kompartimente abziehen. Durch die An- bzw. Abwesenheit von SRAP1 im Zellkern könnte die Stabilität des ER $\alpha$ -Komplexes verändert werden und damit auch die Stärke der Transkription der Zielgene. Über die veränderte Expression von Wnt11, Bcl-2 und/ oder c-Myc wäre das Gleichgewicht zwischen Inhibierung und Induktion des Zelltodes, während und am Ende des chlamydialen Infektionszyklus regulierbar (Ying *et al.*, 2006). Somit stellt die Interaktion zwischen CT441 und SRAP1 und die Reduktion seiner Ko-Aktivator-Aktivität eine neue Möglichkeit der Wirtszellkontrolle durch Chlamydien dar.

Ein weiterer Aspekt ist die spezifische Interaktion zwischen der PDZ-Domäne von CT441 und dem Protein SRAP1. Es gibt einige Veröffentlichungen über die Mutagenese und Selektion von PDZ-Domänen, die neue Zielproteine binden und dadurch Prozesse in der Zelle beeinflussen (Schneider *et al.*, 1999; Junqueira *et al.*, 2003). Ziel war es veränderte PDZ-Domänen zu identifizieren, die spezifisch an Onkogene, wie beispielsweise *c-MYC*, binden und diese inaktivieren (Junqueira *et al.*, 2003). Oder es sollten intrazelluläre

Proteine zu subzellulären Kompartimenten dirigiert werden (Schneider *et al.*, 1999). Letzteres konnte für die PDZ-Domäne in Bezug auf das Protein SRAP1 in dieser Arbeit dargestellt werden (3.3.3). Die Fähigkeit der PDZ-Domäne spezifisch das Protein anzugreifen, aber nicht die RNA, könnte verwendet werden um zwischen den zellulären Funktionen von SRA1 und SRAP1 zu unterscheiden. Dies wäre auch klinisch relevant. In einer Studie von Cooper *et al.* wurde gezeigt, dass sowohl SRAP1-kodierende und nicht-kodierende SRA1 RNAs in Brustzelllinien vorliegen (Cooper *et al.*, 2009). Das Gleichgewicht zwischen diesen beiden genetisch verknüpften Funktionseinheiten wird über alternative *Splicing*-Prozesse gesteuert und könnte ausschlaggebend bei der Regulation der Transkription von Wachstums-, Proliferations- und Apoptose-spezifischen Genen sein. Somit hätte es eine wichtige Rolle bei der Brustkrebsentstehung und -entwicklung. Die Schwierigkeit dieses komplexen SRA1/ SRAP1-Systems liegt in der Unterscheidung der Funktionen. Die selektive Inhibierung von SRAP1 durch die PDZ-Domäne der chlamydialen Protease CT441 könnte ein Hilfsmittel darstellen, um die Effekte auf die ER $\alpha$ -Zielgene einem der beiden Faktoren zuzuschreiben. In der oben genannten Studie wurden T5-Brustkrebszellen mit SRA1-*antisense*-Ribonukleotiden behandelt. Sie wiesen eine erhöhte Expression von nicht-kodierenden SRA1-Transkripten und einen niedrigeren Level des Proteins SRAP1 auf. Die Zellen zeigten eine geringere Lebensfähigkeit (Cooper *et al.*, 2009). Eine Veränderung der *Splicing*-Mechanismen könnte somit einen entscheidenden Einfluss auf das Entstehen und die Entwicklung von Brustkrebs haben und wäre eine potenzielle Therapiemöglichkeit. Der gleiche Effekt auf das Tumorzellwachstum könnte möglich sein, würde man die PDZ-Domäne von CT441 aus *C. trachomatis* als biomedizinisches Werkzeug für die Titration des Proteins SRAP1 verwenden.

Neben der Interaktion der Tsp CT441 aus *C. trachomatis* mit SRAP1 konnte mit der homologen Protease Cpn0555 aus *Cp. pneumoniae* ebenfalls eine Interaktion mit dem humanen SRAP1 gezeigt werden. Sowohl im Hefe-Zweihybrid-System als auch *in vitro* konnte SRAP1 gebunden werden. Damit könnte auch im zweiten humanpathogenen Stamm der Chlamydien der Einfluss der Protease auf die Rezeptoraktivität von ER $\alpha$  sehr bedeutsam sein. Es sind jedoch funktionelle Untersuchungen zu dieser Interaktion nötig um eine Aussage über die Relevanz machen zu können.

### 4.3 Die PDZ-Domäne von CT441 interagiert mit c-Myc in *S. cerevisiae*

Interessanterweise wurde mit der PDZ-Domäne von CT441 im Hefe-Zweihybrid-*Screening* der C-terminale Teil des c-Myc-Proteins als Interaktionspartner identifiziert. In einem weiteren Versuch wurde auch die Interaktion mit dem kompletten c-Myc Protein gemessen. Ein möglicher Abbau von c-Myc durch die Protease CT441 konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden (Daten nicht dargestellt). Allerdings könnte die PDZ-Domäne auch hier als funktionelles Werkzeug betrachtet werden. Wie bereits erwähnt, gibt es Studien, in denen mutierte PDZ-Domänen identifiziert werden, die Onkogene binden und sie möglicherweise inaktivieren (Junqueira *et al.*, 2003). Die humane Serin-Protease Omi wirkt Temperatur-abhängig als Chaperon oder als Protease und besitzt ebenfalls eine PDZ-Domäne. Diese Domäne wurde zufällig mutiert und einer der Klone interagiert mit c-Myc. Die Expression dieses PDZ-Klons in humanen Zellen induzierte die c-Myc-abhängige Apoptose. Die Autoren postulieren, dass solche artifiziellen PDZ-Domänen als *Scaffold*-Werkzeuge spezifische Multi-Proteinkomplexe generieren können. Diese wären dann einsetzbar, um die normalen Funktionen von Proteinen zu verringern, zu erhöhen oder sie in zelluläre Kompartimente zu verlagern und geben ihnen damit eine therapeutische Bedeutung. Über die Bindung an die PDZ-Domäne von CT441 könnte die Funktion von c-Myc als Transkriptionsfaktor verändert werden und damit auch die von c-Myc zu vermittelnden zellulären Antworten auf die chlamydiale Infektion. Jedoch müssen die Art der Einflussnahme von CT441 bzw. der PDZ-Domäne auf c-Myc, sowie die möglichen Folgen und die Relevanz in der Wirtszelle durch umfangreiche funktionelle Studien überprüft werden.

## 5. Ausblick

Die vorliegende Arbeit charakterisiert die direkte Interaktion zwischen dem membranständigen Protein IncA aus *Cp. psittaci* und dem humanen Wirtszellprotein G3BP1. Mithilfe von Immunfluoreszenzmikroskopie konnte sowohl endogenes G3BP1 als auch überexprimiertes, in Stressgranula aggregiertes G3BP1 an der Membran des chlamydialen Einschlusskörpers detektiert werden. Es wurde gezeigt, dass die Infektion von Hep-2-Zellen mit *Cp. psittaci* und die Überexpression von IncA in HEK293-Zellen zur Absenkung der c-Myc-Proteinkonzentration, nicht aber der *c-myc* mRNA, führen. Der Mechanismus, über welchen dieses Ereignis vermittelt wird, ist jedoch unbekannt. Einerseits wurde vermutet, dass c-Myc aufgrund der eingeschränkten Bildung eines De-Ubiquitinylierungskomplexes zwischen G3BP1 und einer Ubiquitin-spezifischen Protease (USP) nicht mehr vor dem proteasomalen Abbau bewahrt wird. Um diese Annahme zu stützen, muss USP10 oder eine andere in Frage kommende USP in Interaktionsstudien und funktionelle Versuche eingegliedert werden. Andererseits wurde die Möglichkeit betrachtet, dass G3BP1 in den Metabolismus der *c-myc* mRNA eingreift und die Verfügbarkeit für die Translation reguliert. Hierfür müsste die Bindung von G3BP1 und *c-myc* näher charakterisiert werden. Über *in-situ*-Hybridisierung könnte die Lokalisierung der *c-myc* mRNA in der normalen und in der infizierten Zelle verglichen werden. Darüber hinaus könnte der Effekt einer Überexpression bzw. eines *Knockdowns* von G3BP1 auf das Proliferationsvermögen und das Überleben der infizierten Zellen analysiert werden. Es wäre ebenfalls sehr aufschlussreich die funktionellen Versuche mit einem IncA<sup>-</sup>-Stamm durchzuführen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch IncA aus *C. trachomatis* mit G3BP1 direkt interagiert. Ob und in welchem Maße diese Interaktion auch in einem humanpathogenen Stamm von Bedeutung ist, kann über die Durchführung der in dieser Arbeit für *Cp. psittaci* gezeigten und der hier vorgeschlagenen Versuche bestimmt werden.

Als zweite funktionelle Interaktion wurde die Bindung des Proteins SRAP1 an die Protease CT441 aus *C. trachomatis* identifiziert. CT441 kann die durch SRAP1 induzierte Ko-Aktivierung des Estrogenrezeptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) vermindern. Über den Einfluss auf die ER $\alpha$ -Aktivität können Chlamydien verschiedene Wirtszellprozesse regulieren. Für eine genauere Charakterisierung der Interaktion und die Bestimmung ihrer Funktion während der Infektion wird ein zelluläres System benötigt, über welches spezifische Zielgene identifiziert werden können. Zusätzlich wurde beschrieben, dass die PDZ-Domäne von

CT441 spezifisch das Protein SRAP1 bindet und die ER $\alpha$ -Aktivierung partiell vermindert. Es könnte untersucht werden, welche Auswirkungen die Expression der PDZ-Domäne *in vivo* auf das Wachstum und Überleben der Zellen hat. Zusätzlich wurde für die Tsp Cpn0555 aus *Cp. pneumoniae* die Interaktion mit SRAP1 nachgewiesen. Cpn0555 weist ebenfalls eine PDZ-Domäne auf. Es könnten auch hier Studien über den Einfluss auf die Rezeptoraktivität von ER $\alpha$  und die Funktion während der Infektion durchgeführt werden.

Da die Interaktion von CT441 und c-Myc lediglich in *S. cerevisiae* gezeigt wurde, müssen hier zunächst weitere Interaktionsstudien durchgeführt werden. Eine mögliche Spaltung von c-Myc bzw. eine Proteinkomplexbildung mit CT441 und die jeweilige Wirkung *in vivo* müssen eingehend untersucht werden.

Selbstverständlich ist es dringend notwendig, weitere neue Interaktionen zwischen chlamydialen und Wirtszellproteinen zu finden. Da Chlamydien noch immer nicht kultivierbar oder genetisch veränderbar sind, können der Ablauf der Infektion sowie die Beeinflussung der Wirtszelle während der verschiedenen Stadien über die Auffindung von Interaktionen besser verstanden werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- Alzhanov, D., Barnes, J., Hruby, D., & Rockey, D.** (2004). Chlamydial development is blocked in host cells transfected with *Chlamydomonas reinhardtii* *incA*. *BMC Microbiol* 4(24) .
- Atlas, R., Behar, L., Elliott, E., & Ginzburg, I.** (2004). The insulin-like growth factor mRNA binding-protein IMP-1 and the Ras-regulatory protein G3BP associate with tau mRNA and HuD protein in differentiated P19 neuronal cells. *J Neurochem* 89(3) , S. 613-626.
- Balin, B., & Appelt, D.** (2001). Role of infection in Alzheimer's disease. *J Am Osteopath Assoc* 101 (12 SPI) , S. 1-6.
- Balsara, Z., Misaghi, S., Lafave, J., & Starnbach, M.** (2006). Chlamydia trachomatis infection induces cleavage of the mitotic cyclin B1. *Infect Immun* 74 , S. 5602-5608.
- Bannantine, J., Griffiths, R., Viratyosin, W., Brown, W., & Rockey, D.** (2000). A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane. *Cell Microbiol* 2 , S. 35-47.
- Beatty, W.** (2006). Trafficking from CD63-positive late endocytic multivesicular bodies is essential for intracellular development of Chlamydia trachomatis. *J Cell Sci* 119 , S. 350-359.
- Beeckman, D., & Vanrompay, D.** (2009). Zoonotic Chlamydomonas psittaci infections from a clinical perspective. *Clin Microbiol Infect* 15 (1) , S. 11-17.
- Beeckman, D., Geens, T., Timmermans, J., Van Oostveldt, P., & Vanrompay, D.** (2008). Identification and characterization of a type III secretion system in Chlamydomonas psittaci. *Vet Res* 39 , S. 27.
- Betts, H., Wolf, K., & Fields, K.** (2009). Effector protein modulation of host cells: examples in the Chlamydia spp. arsenal. *Curr Opin Microbiol* 12 (1) , S. 81-87.
- Bitter, G.** (2007). Regulation of human estrogen receptor  $\alpha$ -mediated gene transactivation in Saccharomyces cerevisiae by human coactivator and corepressor proteins. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103 , S. 189-195.
- Blasi, F., Tarsia, P., & Aliberti, S.** (2009). Chlamydomonas pneumoniae. *Clin Microbiol Infect* 15 (1) , S. 29-35.
- Böhme, L., & Rudel, T.** (2009). Host cell death machinery as a target for bacterial pathogens. *Microbes Infect* 11 , S. 1063-1070.
- Braun, P., Al-Younes, H., Gussmann, J., Klein, J., Schneider, E., & Meyer, T.** (2008). Competitive inhibition of amino acid uptake suppresses chlamydial growth: involvement of the chlamydial amino acid transporter BrnQ. *J Bacteriol* 190 (5) , S. 1822-1830.

- Breeden, L., & Nasmyth, K.** (1987). Cell cycle control of the yeast HO gene: cis- and trans-acting regulators. *Cell* 48 , S. 389-397.
- Brown, W., Skeiky, Y., Probst, P., & Rockey, D.** (2002). Chlamydial antigens colocalize within IncA-laden fibers extending from the inclusion membrane into the host cytosol. *Infect Immun* 70(10) , S. 5860-5864.
- Buchan, J., & Parker, R.** (2009). Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell* 36 , S. 932-941.
- Bush, R., & Everett, K.** (2001). Molecular evolution of the Chlamydiaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 51 , S. 203-220.
- Butt, A., McNeil, C., Musgrove, E., & Sutherland, R.** (2005). Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. *Endocr Relat Cancer* 12 (Suppl 1) , S. 47-59.
- Carabeo, R., Dooley, C., Grieshaber, S., & Hackstadt, T.** (2007). Rac interacts with Abi-1 and WAVE2 to promote an Arp2/3-dependent actin recruitment during chlamydial invasion. *Cell Microbiol* 9 (9) , S. 2278-2288.
- Carabeo, R., Mead, D., & Hackstadt, T.** (2003). Golgi-dependent transport of cholesterol to the Chlamydia trachomatis inclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 , S. 6771-6776.
- Carter, J., & Hudson, A.** (2010). The evolving story of Chlamydia-induced reactive arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 22 (4) , S. 424-430.
- Chellas-Géry, B., Linton, C., & Fields, K.** (2007). Human GCIP interacts with CT847, a novel Chlamydia trachomatis type III secretion substrate, and is degraded in a tissue-culture infection model. *Cell Microbiol* 9 (10) , S. 2417-2430.
- Chooniedass-Kothari, S., Emberley, E., Hamedani, M., Troup, S., Wang, X., Czosnek, A., et al.** (2004). The steroid receptor RNA activator is the first functional RNA encoding a protein. *FEBS Lett* 566(1-3) , S. 43-47.
- Chooniedass-Kothari, S., Hamedani, M., Troup, S., Hubé, F., & Leygue, E.** (2006). The steroid receptor RNA activator protein is expressed in breast tumor tissues. *Int J Cancer* 118(4) , S. 1054-1059.
- Christian, J., Vier, J., Paschen, S., & Häcker, G.** (2010). Cleavage of the NF-κB family protein p65/RelA by the chlamydial protease-like activity factor (CPAF) impairs proinflammatory signaling in cells infected with Chlamydiae. *J Biol Chem* 285 (53) , S. 41320-41327.
- Cocchiario, J., & Valdivia, R.** (2009). New insights into Chlamydia intracellular survival mechanisms. *Cell Microbiol* 11 (11) , S. 1571-1578.



- Cocchiario, J., Kumar, Y., Fischer, E., Hackstadt, T., & Valdivia, H.** (2008). Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the Chlamydia trachomatis parasitophorous vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (27) , S. 9379-9384.
- Cohen, M., Stutz, F., Belgareh, N., & Haguenauer-Tsapis, R.** (2003). Ubp3 requires a cofactor, Bre5, to specifically de-ubiquitinate the COPII protein, Sec23. *Nat Cell Biol* 5 , S. 661-667.
- Coleman, K., Lam, V., Jaber, B., Lanz, R., & Smith, C.** (2004). SRA coactivation of estrogen receptor- $\alpha$  is phosphorylation-independent, and enhances 4-hydroxytamoxifen agonist activity. *Biochem Biophys Res Commun* 323 , S. 332-338.
- Cooper, C., Guo, J., Yan, Y., Chooniedass-Kothari, S., Hube, F., Hamedani, M., et al.** (2009). Increasing the relative expression of endogenous non-coding Steroid Receptor RNA Activator (SRA) in human breast cancer cells using modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 37(13) , S. 4518-4531.
- Cortes, C., Rzomp, K., Tvinnereim, A., Scidmore, M., & Wizel, B.** (2007). Chlamydia pneumoniae inclusion membrane protein Cpn0585 interacts with multiple Rab GTPases. *Infect Immun* 75 (12) , S. 5586-5596.
- Cosentini, R., Tarsia, P., Canetta, C., Graziadei, G., Brambilla, A., Aliberti, S., et al.** (2008). Severe asthma exacerbation: role of acute Chlamydophila pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae infection. *Respir Res* 30 (9:48) , S. 1-6.
- Cristae, I., Carroll, J., Rout, M., Rice, C., Chait, B., & MacDonald, M.** (2006). Tracking and elucidating alphavirus-host protein interactions. *J Biol Chem* 281(40) , S. 30269-30278.
- Delevoeye, C., Nilges, M., Dautry-Varsat, A., & Subtil, A.** (2004). Conservation of the biochemical properties of IncA from Chlamydia trachomatis and Chlamydia caviae. *J Biol Chem* 279 , S. 46896-46906.
- Delevoeye, C., Nilges, M., Dehoux, P., Paumet, F., Perrinet, S., Dautry-Versat, A., et al.** (2008). SNARE protein mimicry by intracellular bacterium. *PLoS Pathog* 4 , S. e1000022.
- Dwyer, M., Joseph, J., HE, W., Eaton, M., Kunder, R., Kazmin, D., et al.** (2010). WNT11 expression is induced by estrogen-related receptor alpha and beta-catenin and acts in an autocrine manner to increase cancer cell migration. *Cancer Res* 70(22) , S. 9298-9308.
- Eilers, M., & Eisenmann, R.** (2008). Myc's broad reach. *Genes Dev* 22 , S. 2755-2766.
- Ellison, A., Lofing, J., & Bitter, G.** (2003). Potentiation of human estrogen receptor alpha-mediated gene expression by steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) in Saccharomyces cerevisiae. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86 , S. 15-26.

- Everett, K., Bush, R., & Andersen, A.** (1999). Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards. *Int J Syst Bacteriol* 49 , S. 415-440.
- Fan, T., Lu, H., Hu, H., Shi, L., McClarty, G., Nance, D., et al.** (1998). Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med* 187 (4) , S. 487-496.
- Fields, K., Fischer, E., & Hackstadt, T.** (2002). Inhibition of fusion of Chlamydia trachomatis inclusions at 32 degrees C correlates with restricted export of IncA. *Infect Immun* 70(7) , S. 3816-3823.
- Fields, S., & Song, O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340 (6230) , S. 245-246.
- Gallouzi, I., Parker, F., Chelib, K., Maurier, F., Labourier, E., Barlat, I., et al.** (1998). A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability. *Mol Cell Biol* 18 , S. 3956-3965.
- Gee, S., Quenneville, S., Lombardo, C., & Chabot, J.** (2000). Single-amino acid substitutions alter the specificity and affinity of PDZ domains for their ligands. *Biochemistry* 39 , S. 14638-14646.
- Giles, D., & Wyrick, P.** (2008 ). Trafficking of chlamydial antigens to the endoplasmic reticulum of infected epithelial cells. *Microbes Infect* 10(14-15) , S. 1494-1503.
- Greene, W., & Zhong, G.** (2003). Inhibition of host cell cytokinesis by Chlamydia trachomatis infection. *J Infect* 47 , S. 45-51.
- Guitard, E., Parker, F., Millon, R., Abecassis, J., & Tocque, B.** (2001). G3BP is overexpressed in human tumors and promotes S phase entry. *Cancer Lett* 162 , S. 213-221.
- Guseva, N., Dessus-Babus, S., Whittimore, J., Moore, C., & Wyrick, P.** (2005). Characterization of estrogen-responsive epithelial cell lines and their infectivity by genital Chlamydia trachomatis. *Microbes Infect* 7(15) , S. 1469-1481.
- Hackstadt, T., Rockey, D., Heinzen, R., & Scidmore, M.** (1996). Chlamydia trachomatis interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *EMBO J* 15 , S. 964-977.
- Hackstadt, T., Scidmore, M., & Rockey, D.** (1995). Lipid metabolism in Chlamydia trachomatis-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 , S. 4877-4881.

- Hackstadt, T., Scidmore-Carlson, M., Shaw, E., & Fischer, E.** (1999). The Chlamydia trachomatis IncA protein is required for homotypic vesicle fusion. *Cell Microbiol* 1 , S. 119-130.
- Hayden, M., West, A., & Ghosh, S.** (2006). NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25 , S. 6758-6780.
- Hermeking, H., & Eicke, D.** (1994). Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* 265 , S. 2091-2093.
- Heuer, D., Brinkmann, V., Meyer, T., & Szczeppek, A.** (2003). Expression and translocation of chlamydial protease during acute and persistent infection of the epithelial HEp-2 cells with Chlamydia (Chlamydia) pneumoniae. *Cell Microbiol* 5 (5) , S. 315-322.
- Heuer, D., Rejman Lipinski, A., Machuy, N., Karlas, A., Wehrens, A., Siedler, F., et al.** (2009). Chlamydia causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction. *Nature* 457 (7230) , S. 731-735.
- Hogan, R., Mathews, S., Mukhopadhyay, S., ummersgill, J., & Timms, P.** (2004). Chlamydial Persistence: beyond the Biphasic Paradigm. *Infect Immun* 72 (4) , S. 1843-55.
- Horoschak, K., & Moulder, J.** (1978). Division of single host cells after infection with chlamydiae. *Infect Immun* 19 , S. 281-286.
- Hower, S., Wolf, K., & Fields, K.** (2009). Evidence that CT694 is a novel Chlamydia trachomatis T3S substrate capable of functioning during invasion or early cycle development. *Mol Microbiol* 72 (6) , S. 1423-37.
- Irvine, K., Stirling, R., Hume, D., & Kennedy, D.** (2004). Rasputin, more promiscuous than ever: a review of G3BP. *Int J Dev Biol* 48 , S. 1065-1077.
- Jensen, E., & Jordan, V.** (2003). The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res* 9 , S. 1980-1989.
- Jewett, T., Fischer, E., Mead, D., & Hackstadt, T.** (2006). Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 , S. 15599-15604.
- Junqueira, D., Cilenti, L., Musumeci, L., Sedivy, J., & Zervos, A.** (2003). Random mutagenesis of PDZ(Omi) domain and selection of mutants that specifically bind the Myc proto-oncogene and induce apoptosis. *Oncogene* 22(18) , S. 2772-2781.
- Kalman, S., Mitchell, W., Marathe, R., Lammel, C., Fan, J., Hyman, R., et al.** (1999). Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis. *Nat Genet* 21 , S. 385-9.
- Kedersha, N., & Anderson, P.** (2002). Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* 30(6) , S. 963-969.

- Kennedy, D., French, J., Guitard, E., Ru, K., Tocque, B., & Mattick, J.** (2001). Characterization of G3BPs: tissue specific expression, chromosomal localisation and rasGAP(120) binding studies. *J Cell Biochem* 84(1) , S. 173-187.
- Kennedy, M.** (1995). Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *Trends Biochem Sci* 20(9) , S. 350.
- Kim, M., Wiederschain, D., Kennedy, D., Hansen, E., & Yuan, Z.** (2007). Modulation of p53 and MDM2 activity by novel interaction with Ras-GAP binding proteins (G3BP). *Oncogene* 26(29): , S. 4209-4215.
- Lad, S., Li, J., da Silva Correia, J., Pan, Q., Gadwal, S., Ulevitch, R., et al.** (2007a). Cleavage of p65/RelA of the NF- $\kappa$ B pathway by Chlamydia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 , S. 2933-2938.
- Lad, S., Yang, G., Scott, D., Wang, G., Nair, P., Mathison, J., et al.** (2007b). Chlamydial CT441 is a PDZ domain-containing tail-specific protease that interferes with the NF- $\kappa$ B pathway of immune response. *J Bacteriol* 189 , S. 6619-6625.
- Lane, B., Mutchler, C., Al Khodor, S., Grieshaber, S., & Carabeo, R.** (2008). Chlamydial entry involves TARP binding of guanine nucleotide exchange factors. *PLoS Pathog* 4(3) , S. e1000014.
- Lanz, R., Chua, S., Barron, N., Söder, B., DeMayo, F., & O'Malley, B.** (1999). Steroid receptor RNA activator stimulates proliferation as well as apoptosis in vivo. *Cell* 97 , S. 17-27.
- Le Negrate, G., Krieg, A., Faustin, B., Loeffler, M., Godzik, A., Krajewski, S., et al.** (2008). ChlaDub1 of Chlamydia trachomatis suppresses NF-kappaB activation and inhibits IkappaBalpha ubiquitination and degradation. *Cell Microbiol* 10 , S. 1879-1892.
- Lin, Z., Reierstad, S., Huang, C., & Bulun, S.** (2007). Novel estrogen receptor-alpha binding sites and estradiol target genes identified by chromatin immunoprecipitation cloning in breast cancer. *Cancer Res* 67(10) , S. 5017-5024.
- Luostarinen, T., Lehtinen, M., Bjørge, T., Abeler, V., Hakama, M., Hallmans, G., et al.** (2004). Joint effects of different human papillomaviruses and Chlamydia trachomatis infections on risk of squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Eur J Cancer* 40 , S. 1058-1065.
- McKenna, N., & O'Malley, B.** (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108 , S. 465-474.
- Meyer, N., & Penn, L.** (2008). Reflecting on 25 years with MYC. *Nature Rev Cancer* 3 , S. 976-990.
- Moulder, J.** (1991). Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev* 55 , S. 143-190.

- Nilsson, J., & Cleveland, J.** (2003). Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* 22(56) , S. 9007-9021.
- O'Lone, R., Frith, M., Karlsson, E., & Hansen, U.** (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 18(8) , S. 1859-1875.
- Paavonen, J., & Eggert-Kruse, W.** (1999). Chlamydia trachomatis: impact on human reproduction. *Hum Reprod Update* 5 , S. 433-47.
- Paetzel, M., & Dalbey, R.** (1997). Catalytic hydroxyl/amine dyads within serine proteases. *Trends Biochem* 22 , S. 28-31.
- Parker, F., Maurier, F., Delumeau, I., Duchesne, M., Faucher, D., Debussche, L., et al.** (1996). A Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein. *Mol Cell Biol* 16(6) , S. 2561-2569.
- Paschen, S., Christian, J., Vier, J., Schmidt, F., Walch, A., Ojcius, D., et al.** (2008). Cytopathicity of Chlamydia is largely reproduced by expression of a single chlamydial protease. *J Cell Biol* 182 (1) , S. 117-127.
- Paumet, F., Wesolowski, J., Garcia-Diaz, A., Delevoye, C., Aulner, N., Shuman, H., et al.** (2009). Intracellular bacteria encode inhibitory SNARE-like proteins. *PLoS ONE* 4 , S. e7375.
- Pennini, M., Perrinet, S., Dautry-Varsat, A., & Subtil, A.** (2010). Histone methylation by NUE, a novel nuclear effector of the intracellular pathogen Chlamydia trachomatis. *PLoS Pathog* 6 (7) , S. e1000995.
- Pesonen, E., El-Segaier, M., Persson, K., Puolakkainen, M., Sarna, S., Ohlin, H., et al.** (2009). Infections as a stimulus for coronary occlusion, obstruction, or acute coronary syndromes. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 3(6) , S. 447-454.
- Peters, J., Hess, S., Endlich, K., Thalmann, J., Holzberg, D., Kracht, M., et al.** (2005). Silencing or permanent activation: host-cell responses in models of persistent Chlamydia pneumoniae infection. *Cell Microbiol* 7 (8) , S. 1099-1108.
- Peters, J., Wilson, D., Myers, G., Timms, P., & Bavoil, P.** (2007). Type III secretion a la Chlamydia. *Trends Microbiol* 15 (6) , S. 241-251.
- Picard, D., Khursheed, B., Garabedian, M., Fortin, M., Lindquist, S., & Yamamoto, K.** (1990). Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature* 348(6297) , S. 166-168.
- Pirbhai, M., Dong, F., Zhong, Y., Pan, K., & Zhong, G.** (2006). The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading pro-apoptotic BH3-only proteins in Chlamydia trachomatis-infected cells. *J Biol Chem* 281 (42) , S. 31495-31501.

- Popov, N., Wanzel, M., Madiredjo, M., Zhang, D., Beijersbergen, R., Bernards, R., et al.** (2007). The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability. *Nat Cell Biol* 9(7), S. 765-774.
- Pospischil, A., Thoma, R., Hilbe, M., Grest, P., & Gebbers, J.** (2002). Abortion in woman caused by caprine *Chlamydomphila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). *Swiss Med Wkly* 132, S. 64-66.
- Prigent, M., Barlat, I., Langen, H., & Dargemont, C.** (2000). IkappaBalpha and IkappaBalpha/NF-kappa B complexes are retained in the cytoplasm through interaction with a novel partner, RasGAP SH3-binding protein 2. *J Biol Chem* 275, S. 36441-36449.
- Rajalingam, K., Sharma, M., Lohmann, C., Oswald, M., Thieck, O., Froelich, C., et al.** (2008). Mcl-1 is a key regulator of apoptosis resistance in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *PLoS ONE* 3, S. e3102.
- Rajalingam, K., Sharma, M., Paland, N., Hurwitz, R., Thieck, O., Oswald, M., et al.** (2006). IAP-IAP complexes required for apoptosis resistance of *C. trachomatis*-infected cells. *PLoS Pathog* 2, S. e114.
- Read, T., Myers, G., Brunham, R., Nelson, W., Paulsen, I., Heidelberg, J., et al.** (2003). Genome sequence of *Chlamydomphila caviae* (*Chlamydia psittaci* GPIC): examining the role of niche-specific genes in the evolution of the Chlamydiaceae. *Nucleic Acids Res* 31 (8), S. 2134-2147.
- Rockey, D., Grosenbach, D., Hruby, D., Peacock, M., Heinzen, R., & Hackstadt, T.** (1997). *Chlamydia psittaci* IncA is phosphorylated by the host cell and is exposed on the cytoplasmic face of the developing inclusion. *Mol Microbiol* 24, S. 217-228.
- Rockey, D., Heinzen, R., & Hackstadt, T.** (1995). Cloning and characterization of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells. *Mol Microbiol* 15 (4), S. 617-626.
- Rockey, D., Scidmore, M., Bannantine, J., & Brown, W.** (2002). Proteins in the chlamydial inclusion membrane. *Microbes Infect* 4 (3), S. 333-340.
- Rohde, G., Straube, E., Essig, A., Reinhold, P., & Sachse, K.** (2010). Chlamydial Zoonoses. *Dtsch Arztebl Int* 107 (10), S. 174-180.
- Rzomp, K., Moorhead, A., & Scidmore, M.** (2006). The GTPase Rab4 interacts with *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein CT229. *Infect Immun* 74 (9), S. 5362-5373.
- Rzomp, K., Scholtes, L., Briggs, B., Whittaker, G., & Scidmore, M.** (2003). Rab GTPases are recruited to chlamydial inclusions in both a species-dependent and species-independent manner. *Infect Immun* 71 (10), S. 5855-5870.

- Saier, M.** (2006). Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J Membr Biol* 214 (2) , S. 75-90.
- Schlott, T., Eiffert, H., Bohne, W., Landgrebe, J., Brunner, E., Spielbauer, B., et al.** (2005). Chlamydia trachomatis modulates expression of tumor suppressor gene calveolin-1 and oncogene C-myc in the transformation zone of non-neoplastic cervical tissue. *Gynecol Oncol* 98 , S. 409-419.
- Schneider, S., Buchert, M., Georgiev, O., Catimel, B., Halford, M., Stacker, S., et al.** (1999). Mutagenesis and selection of PDZ domains that bind new protein targets. *Nature Biotechnol* 17 , S. 170-175.
- Scidmore, M., & Hackstadt, T.** (2001). Mammalian 14-3-3 $\beta$  associates with the Chlamydia trachomatis inclusion membrane via its interaction with IncG. *Mol Microbiol* 39 , S. 1638-1680.
- Scidmore, M., Fischer, E., & Hackstadt, T.** (2003). Restricted fusion of Chlamydia trachomatis vesicles with endocytic compartments during the initial stages of infection. *Infect Immun* 71 , S. 973-984.
- Shaw, A., Vandahl, B., Larsen, M., Roepstorff, P., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., et al.** (2002). Characterization of a secreted Chlamydia protease. *Cell Microbiol* 4(7) , S. 411-424.
- Silins, I., Ryd, W., Strand, A., Wadell, G., Törnberg, S., Hansson, B., et al.** (2005). Chlamydia trachomatis infection and persistence of human papillomavirus. *Int J Cancer* 116 , S. 110-115.
- Soncini, C., Berdo, I., & Draetta, G.** (2001). Ras-GAP SH3 domain binding protein (G3BP) is a modulator of USP10, a novel human ubiquitin specific protease. *Oncogene* 20 , S. 3869-3879.
- Stenner-Liewen, F., Liewen, H., & Zapata, J.** (2002). CADD, a Chlamydia protein that interacts with death receptors. *J Biol Chem* 277 (12) , S. 9633-9636.
- Stephens, R., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., et al.** (1998). Genome Sequence of an Obligate Intracellular Pathogen of Humans: Chlamydia trachomatis. *Science* 282 , S. 754-759.
- Stratton, C., & Wheldon, D.** (2006). Multiple sclerosis: an infectious syndrome involving Chlamydophila pneumoniae. *Trends Microbiol* 14 (11) , S. 474-479.
- Su, H., McClarty, G., Dong, F., Hatch, G., Pan, Z., & Zhong, G.** (2004). Activation of Raf/MEK/ERK/cPLA2 signaling pathway is essential for chlamydial acquisition of host glycerophospholipids. *J Biol Chem* 279 , S. 9409-9416.
- Suchland, R., Rockey, D., Bannantine, J., & Stamm, W.** (2000). Isolates of Chlamydia trachomatis that occupy nonfusogenic inclusions lack IncA, a protein localized to the inclusion membrane. *Infect Immun* 68(1) , S. 360-367.

- Tjaden, J., Winkler, H., Schwöppe, C., Van Der Laan, M., Möhlmann, T., & Neuhaus, H.** (1999). Two nucleotide transport proteins in *Chlamydia trachomatis*, one for net nucleoside triphosphate uptake and the other for transport of energy. *J Bacteriol* 181 (4) , S. 1196-1202.
- Tourriere, H., Chebil, K., Zekri, L., Courselaud, B., Blanchard, J., Bertrand, E., et al.** (2003). The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol* 160 , S. 823-831.
- Tourriere, H., Gallouzi, I., Chebli, K., Capony, J., Mouaikel, J., van der Geer, P., et al.** (2001). RasGAP-associated endoribonuclease G3BP: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization. *Mol Cell Biol* 21(22) , S. 7747-7760.
- Uysal-Onganer, P., Kawano, Y., Caro, M., Walker, M., Diez, S., Darrington, R., et al.** (2010). Wnt-11 promotes neuroendocrine-like differentiation, survival and migration of prostate cancer cells. *Mol Cancer* 9 , S. 55.
- Valdivia, R.** (2008). Chlamydia effector proteins and new insights into chlamydial cellular microbiology. *Curr Opin Microbiol* 11 , S. 53-59.
- Verbeke, P., Welter-Stahl, L., Ying, S., Hansen, J., Häcker, G., Darville, T., et al.** (2006). Recruitment of BAD by the *Chlamydia trachomatis* vacuole correlates with host-cell survival. *PLoS Pathog* 2 (5) , S. e45.
- Wolf, K., Plano, G., & Fields, K.** (2009). A protein secreted by the respiratory pathogen *Chlamydia pneumoniae* impairs IL-17 signaling via interaction with human Act1. *Cell Microbiol* 11 , S. 769-779.
- Wylie, J., Hatch, G., & McClarty, G.** (1997). Host cell phospholipids are trafficked to and then modified by *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol* 179 , S. 7233-7242.
- Ying, S., Fischer, S., Pettengill, M., Conte, D., Paschen, S., Ojcius, D., et al.** (2006). Characterization of host cell death induced by *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 74 (11) , S. 6057-6066.
- Zhong, G., Fan, P., Ji, H., Dong, F., & Huang, Y.** (2001). Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *J Exp Med* 193 (8) , S. 935-942.
- Zindy, F., Eischen, C., Randle, D., Kamijo, T., Cleveland, J., Sherr, C., et al.** (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12(15) , S. 2424-2433.



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklungszyklus der Chlamydien. ....	3
Abbildung 2: Typ-III-Sekretionssystem. ....	8
Abbildung 3: Hefe-Zweihibrid-System. ....	9
Abbildung 4: Domänenstruktur von G3BP1. ....	11
Abbildung 5: Schematische Struktur der Protease CT441. ....	13
Abbildung 6: SRA1 als Ko-Aktivator von ER $\alpha$ . ....	14
Abbildung 7: IncA aus <i>Cp. psittaci</i> und das humane G3BP1 interagieren im Hefe-Zweihibrid-System. ....	41
Abbildung 8: Die Gesamtproteine IncA aus <i>Cp. psittaci</i> und G3BP1 interagieren <i>in vitro</i> . ....	42
Abbildung 9: GST-Pulldown mit HEp-2-Zelllysat. ....	43
Abbildung 10: IncA aus <i>Cp. psittaci</i> und G3BP1 interagieren <i>in vivo</i> in HEK293-Zellen. ....	44
Abbildung 11: G3BP1 konzentriert sich in <i>Cp. psittaci</i> -infizierten HEp-2-Zellen um die Einschlusskörper. ....	45
Abbildung 12: Die <i>c-myc</i> mRNA wird in HEp-2-Zellen durch die Infektion mit <i>Cp. psittaci</i> nicht beeinflusst. ....	47
Abbildung 13: Die c-Myc-Proteinkonzentration nimmt in <i>Cp. psittaci</i> -infizierten HEp-2-Zellen ab. ....	48
Abbildung 14: Einfluss der Expression von IncA und einer IncA-Mutante auf die c-Myc-Proteinkonzentration in HEK392-Zellen. ....	49
Abbildung 15: Einfluss des siRNA- <i>Knockdowns</i> von G3BP1 auf die c-Myc-Proteinkonzentration und <i>c-myc</i> mRNA. ....	50
Abbildung 16: IncA aus <i>C. trachomatis</i> interagiert mit G3BP1 im Hefe-Zweihibrid-System. ....	51
Abbildung 17: IncA aus <i>C. trachomatis</i> interagiert direkt mit G3BP1 <i>in vitro</i> . ....	52
Abbildung 18: Die PDZ-Domäne von CT441 interagiert mit SRAP1 im Hefe-Zweihibrid-System. ....	54
Abbildung 19: CT441 und SRAP1 interagieren <i>in vitro</i> . ....	54
Abbildung 20: Die Expression der NLS-fusionierten PDZ-Domäne von CT441 in HEK293-Zellen führt zu einer Anreicherung von SRAP1 im Zellkern. ....	56
Abbildung 21: SRAP1 wird nicht durch CT441 abgebaut. ....	56
Abbildung 22: Die PDZ-Domäne von CT441 vermindert partiell die durch SRAP1 vermittelte Ko-Aktivierung des Estrogenrezeptors $\alpha$ in <i>S. cerevisiae</i> . ....	58
Abbildung 23: Die Expression des mutierten SRAP1-STOP-Konstrukts führt zu einer mittelstarken Stimulation von ER $\alpha$ . ....	58
Abbildung 24: Die Ligand-unabhängige Ko-Aktivierung der ER $\alpha$ -AF1-Domäne durch SRAP1 in HEK293-Zellen wird durch CT441 unterdrückt. ....	59
Abbildung 25: Die Protease Cpn0555 interagiert mit SRAP1 im Hefe-Zweihibrid-System. ....	61
Abbildung 26: Die Protease Cpn0555 aus <i>Cp. pneumoniae</i> interagiert <i>in vitro</i> direkt mit SRAP1. ....	62
Abbildung 27: Die PDZ-Domäne von CT441 interagiert mit c-Myc in Hefe-Zweihibrid-System. ....	63
Abbildung 28: Möglicher Einfluss der Interaktion von IncA und G3BP1 auf die c-Myc-Proteinkonzentration. ....	68

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sekretierte chlamydiale Effektorproteine.....	7
Tabelle 2: Verwendete Zelllinien.....	16
Tabelle 3: Verwendete <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( <i>S. cerevisiae</i> )-Stämme.....	17
Tabelle 4: Verwendete Vektoren und Plasmide.....	17
Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide.....	19
Tabelle 6: Verwendete Primär-Antikörper.....	24
Tabelle 7: Verwendete Sekundär-Antikörper.....	24
Tabelle 8: PCR-Programm:.....	29
Tabelle 9: Titerbestimmung von Chlamydien.....	34
Tabelle 10: PCR-Programm <i>Two step</i> .....	35

## Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.....	32
Formel 2: Berechnung des Chlamydientiters.....	34

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Nicole Borth, geboren am 07. August 1983 in Bad Salzungen, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation mit dem Thema „Funktionelle Charakterisierung neuer Interaktionen zwischen chlamydialen Proteinen und Wirtszellproteinen“ selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich Dr. Frank Hänel bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung der Manuskripte unterstützt hat,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe

und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 01. Februar 2011

## Wissenschaftliche Beiträge

### Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikationen

**Borth N, Massier J, Franke C, Sachse K, Saluz HP, Hänel F (2010)**

“Chlamydial protease CT441 interacts with SRAP1 co-activator of estrogen receptor alpha and partially alleviates its co-activation activity.” *J Steroid Biochem Mol Biol* 119(1-2):89-95

**Borth N, Litsche K, Franke C, Sachse K, Saluz HP, Hänel F (2011)**

“Functional interaction between type III-secreted protein IncA of *Chlamydophila psittaci* and host cell Ras-GTPase activating protein SH3 domain binding protein 1 (G3BP1).” *PLoS ONE* 6(1):e16692

### Weitere Publikation

**Borth N, Walther A, Reijnt P, Jorde S, Schaub Y, Wendland J (2010)**

“*Candida albicans* Vrp1 is required for polarized morphogenesis and interacts with Wall1 and Myo5.” *Microbiology* 156(10):2962-9

### Vorträge

- |         |  |
|---------|--|
| 03/2009 | 7. Deutscher Chlamydien-Workshop, Lübeck, “Type III-secreted protein IncA of <i>Chlamydophila psittaci</i> interacts with the host cell protein G3BP1”   |
| 05/2009 | 3. Treffen des BMBF-Netzwerkes "Zoonotische Chlamydien", Jena, “Type III-secreted protein IncA of <i>Chlamydophila psittaci</i> interacts with the host cell protein G3BP1”                    |
| 02/2010 | 8. Deutscher Chlamydien-Workshop, Herrsching/München, “Chlamydial protease CT441 interacts with SRAP1 co-activator of estrogen receptor a and partially alleviates its co-activation activity” |
| 10/2010 | Friedrich-Loeffler-Institut, Jena, “Investigation of new interactions between chlamydial and host cell proteins”   |

### Poster

- |         |   |
|---------|---|
| 10/2009 | Nationales Symposium für Zoonoseforschung, Berlin, “Type III-secreted protein IncA of <i>Chlamydophila psittaci</i> interacts with the host cell protein G3BP1” |
|---------|---|

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Hans-Knöll-Institut, in Jena, in der Abteilung Zell- und Molekularbiologie angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit und darüber hinaus unterstützten:

Herrn Prof. Dr. Hans Peter Saluz danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Abteilung anzufertigen, aber auch für die wissenschaftlichen Anregungen und seine Diskussionsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Frank Hänel. Nicht nur für seine fachliche Unterstützung und hilfreichen Diskussionen, sondern vor allem für die ständige Ermutigung vorwärts zu blicken. Vielen Dank!

Claudia danke ich dafür, dass sie mir sowohl technisch als auch menschlich stets eine außergewöhnliche Hilfe war. Mit ihren lebensklugen Weisheiten hat sie so manches große Problem kleiner gemacht. Ich danke dir!

Für den angenehmen und freundschaftlichen Umgang danke ich meinen lieben Mitarbeiterinnen aus dem Labor B110: Anja, Anne, Adeline, Uta und Selina. Es war einfach super! Und danke für's Reinstellen.

Weiterhin danke ich Sveta sowie Grit und allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Zell- und Molekularbiologie für die gute und fachliche Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Elisabeth M. Liebler-Tenorio sowie allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Pathologie/Histologie vom IMP Jena danke ich für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor und die gute Kooperation. Herrn Dr. Konrad Sachse danke ich für die fachliche Unterstützung und sein koordinatives Wirken.

Ich möchte meinen lieben Freunden danken, die mich durch aufbauende und amüsante Gespräche und auch durch so manche Feier auf bessere Gedanken gebracht haben. Besonderer Dank gilt Thorgi - danke für deine liebevolle Unterstützung und deine aufbauenden Worte; Heiki - danke für dein ehrliches Interesse und die Ruhe, die du mir gibst; Liane und Torsten - danke für die vielen schönen Unternehmungen und das immer leckere Essen; Manu und seiner Familie - danke, dass ihr mich über viele Jahre begleitet und unterstützt habt; und danke auch an meine Schulfreunde Caro, Stefan und Sebastian, die manchmal weg waren, aber umso herzlicher immer wieder in Erscheinung getreten sind.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken, die mich in jeder Hinsicht liebevoll unterstützt hat. Ohne eure Kraft wäre ich nicht so weit gekommen.